

**MIKROLEVÄ LYPSYLEHMIEN VALKUAISREHUNA
– VAIKUTUS SYÖNTIIN, AINEENVAIHDUNTAAN JA
MAIDONTUOTANTOON**

Vappu Ylinen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kotieläinten ravitsemustiede
Lokakuu 2015



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Vappu Ylinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Mikrolevä lypsylehmien valkuaisrehuna – vaikutus syöntiin, aineenvaihduntaan ja maidontuotantoon			
Oppiaine /Läroämne – Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika/Datum – Month and year Lokakuu 2015	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 63 s.
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Mikrolevät ovat potentiaalinen kotieläinten valkuaisrehu, sillä ne sisältävät yleensä paljon raakavaluaista ja ravitsemuksellisesti hyviä rasvahappoja. Mikrolevät kasvavat nopeasti, tarvitsevat vain vähän ravinteita ja niitä voidaan kasvattaa alueilla, jotka ovat sopimattomia muuhun viljelyyn. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, voidaanko mikrolevällä korvata lypsylehmien valkuaisrehuna käytettävää rypsiä. Tutkimuksessa tarkasteltiin, miten rypsin korvaaminen osittain tai kokonaan mikrolevällä vaikuttaa lehmien kuiva-aineen syöntiin, ravintoaineiden sulavuuteen, plasman aminohappopitoisuuksiin ja aineenvaihduntatuotteisiin, maitorauhasen aineenvaihduntaan sekä maitotuotokseen ja maidon koostumukseen. Hypoteesina oli, että mikrolevä maittaa heikommin kuin rypsi, ja sen vuoksi lehmien kuiva-aineen syönti jää vähäisemmäksi mikroleväruokinnossa. Toinen hypoteesi oli, että mikrolevä sisältää vähemmän histidiiniä kuin rypsi, ja sen vuoksi maito- ja valkuaisuutos jäävät mikroleväruokinnossa pienemmiksi kuin käytettäessä valkuaisrehuna rypsiä. Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa. Kokeessa oli mukana kuusi ayrshirelehmää. Koemalli oli toistettu 3 x 3 latinalainen neliö. Koejakson pituus oli 3 viikkoa. Kontrollikäsittelynä oli rypsiuokinta (2,3 kg ilmakuivana). Kaksi muuta koekäsittelyä olivat ruokinta, jossa mikrolevä (<i>Spirulina platensis</i> ja <i>Chlorella vulgaris</i> 1:1 seos) korvasi puolet rypsin valkuaisesta ja ruokinta, jossa mikrolevä korvasi rypsin valkuaisen kokonaan. Kaikissa koekäsittelyissä lehmät saivat lisäksi viljaleikettä siten, että väkirehun osuus oli vakio (11 kg/pv) sekä vapaasti nurmisäilörehua. Rypsin korvaaminen osittain tai kokonaan mikrolevällä ei vaikuttanut lehmien kuiva-aineen syöntiin tai ravintoaineiden sulavuuteen. Mikroleväruokinnossa histidiinin saanti oli pienempää kuin rypsiuokinnassa. Pienempi histidiinin saanti näkyi plasman histidiinipitoisuuden suoraviivaisena vähenemisenä (56,5 – 50,5 µmol/l) mikrolevän korvatussa rypsiä, mutta ei vaikuttanut maitotuotokseen tai maidon valkuais- tai rasvatuotoksiin. Koekäsittelyt eivät vaikuttaneet plasman aineenvaihduntatuotteisiin tai maitorauhasen aineenvaihduntaan. Lehmien plasman histidiinipitoisuus oli suuri kaikissa ruokinnossa, mikä saattoi vaikuttaa siihen, että dieetistä saatavan histidiinin määrän väheneminen ei näkynyt maito- ja valkuaisuotoksissa. Lisäksi kokeen lehmät olivat myöhäisessä laktaatiokauden vaiheessa, mikä saattoi tasoittaa eroja koekäsittelyiden välillä. Valkuaisrehujen erilainen rasvahappokoostumus heijastui maitorasvan rasvahappokoostumukseen, mutta muutokset olivat määrällisesti pieniä.</p> <p>Tämän tutkimuksen tulosten perusteella mikrolevää voidaan käyttää lypsylehmien valkuaisrehuna. Mikrolevällä voitiin laktaatiokauden lopulla korvata rypsi joko kokonaan tai osittain ilman, että lypsylehmien kuiva-aineen syönti, maitotuotos, maitovalkuaisen tai -rasvan tuotos vähenivät.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords lypsylehmä, mikrolevä, maidontuotanto, valkuaisrehu, rypsi, <i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Työtä ohjasivat professori Aila Vanhatalo ja tutkijatohtori Anni Halmemies-Beauchet-Filleau.			



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution – Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä/Författare – Author Vappu Ylinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Micro algae as protein supplement in dairy cows – effects on intake, metabolism and milk production			
Oppiaine / Läroämne – Subject Animal nutrition			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis		Aika/Datum – Month and year Ocktober 2015	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 63 p.
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Micro algae are potential protein supplement for farm animals as micro algae are often rich in protein and contain nutritionally beneficial fatty acids. Micro algae grow rapidly and with low nutrient requirements, and can be cultivated in areas that are not suitable for cultivation of other food or feed. The aim of this study was to investigate whether micro algae can be used as an alternative protein supplement for rapeseed meal for dairy cows. We investigated how partial or total replacement of rapeseed meal with micro algae affects levels of dry matter intake, plasma concentrations of amino acids and metabolites, mammary gland metabolism, milk yield, and milk composition in dairy cows. Our hypothesis was that micro algae is less palatable than rapeseed meal, and therefore dry matter intake is lower in micro algae diets. Our second hypothesis was that micro algae contain less histidine than rapeseed meal, and therefore the milk and protein yields are lower in micro algae diets. The study was conducted at the research farm of University of Helsinki. Six multiparous Finnish Ayrshire cows participated in this experiment. The study design was a replicated 3 x 3 Latin square with 3-week periods. In the control diet, the protein supplement was rapeseed meal (2,3 kg air dry). The two other treatments were a diet where micro algae (<i>Spirulina platensis</i> and <i>Chlorella vulgaris</i> 1:1 mixture) replaced half of the rapeseed meal protein, and a diet where micro algae replaced all of the protein of rapeseed meal. In all diets, the cows were offered cereal-based concentrates, so that total concentrate portion was 11 kg /d and grass silage ad libitum.</p> <p>Replacing rapeseed meal partly or completely with micro algae had no effect on dry matter intake or digestibility of nutrients. In the micro algae diets, histidine intake was lower than in the control rapeseed diet. Lower histidine intake decreased the plasma histidine concentration linearly (56,5 – 50,5 µmol/l) but had no effect on milk, protein, or fat yields. Micro algae treatment had no effect on plasma metabolites or mammary gland metabolism. Plasma histidine concentration was high in all treatments, which may explain why the milk and protein yields did not decrease with micro algae diets. In addition, the cows were in late lactation, which may have attenuated the differences between treatments. The differences in fatty acid compositions between rapeseed and micro algae were reflected in the milk fatty acid compositions. However, the differences in milk fatty acid compositions were very small.</p> <p>This study suggests that micro algae can be used as a protein source for dairy cows. Micro algae can replace rapeseed meal partly or completely for dairy cows in late lactation without adverse effects in dry matter intake, or milk, protein, or fat yields.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords dairy cow, micro algae, milk production, protein supplement, rapeseed meal, <i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Professor Aila Vanhatalo and postdoctoral researcher Anni Halmemies-Beauchet-Filleau			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO.....	5
1.1 Lypsylehmien valkuaisrehut.....	5
1.2 Mikrolevät	7
1.3 Mikrolevien kemiallinen koostumus	8
1.4 Mikrolevien käyttö kotieläinten ruokinnassa.....	11
1.5 Tutkielman tavoitteet.....	15
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	15
2.1. Koeasetelma ja koeruokinnat	15
2.2 Rehujen jako	17
2.3 Näytteiden keruu.....	18
2.3.1 Elopaino	18
2.3.2 Rehut	18
2.3.3 Maitotuotos ja maidon koostumus	19
2.3.4 Pötsinäytteet.....	19
2.3.5 Verinäytteet	20
2.3.6 Sontanäytteet	20
2.4 Kemialliset analyysit.....	20
2.5 Tulosten laskeminen ja tilastolliset menetelmät.....	22
3 TULOKSET.....	25
3.1 Koerehujen koostumus.....	25
3.2 Kuiva-aineen syöinti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus	28
3.3 Plasman aminohapot ja aineenvaihduntatuotteet.....	29
3.4 Maitorauhasen aineenvaihdunta.....	30
3.5 Maitotuotokset, maidon pitoisuudet ja maidon rasvahapot	31
4 TULOSTEN TARKASTELU	34
4.1 Koerehujen koostumus.....	34
4.2 Kuiva-aineen syöinti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus	36
4.3 Plasman aminohapot ja aineenvaihduntatuotteet.....	39
4.4 Maitorauhasen aineenvaihdunta.....	45
4.5 Maitotuotokset, maidon pitoisuudet ja maidon rasvahapot	47
5. JOHTOPÄÄTÖKSET	51
KIITOKSET	53
LÄHDELUETTELO	54
LIITE 1.	63

1 JOHDANTO

1.1 Lypsylehmien valkuaisrehut

Vuonna 2050 maapallolla oletetaan olevan 9,2 miljardia ihmistä. FAOn (2009) arvion mukaan tämän kokoisen väestön ruokkiminen vaatii ruoantuotannon lisäämistä 70% vuoden 2005 tasosta. Samanaikaisesti kehittyvien maiden väestö vaurastuu ja eläinperäisten tuotteiden kysyntä kasvaa. Eläinperäinen ruoantuotanto vaatii enemmän peltopinta-alaa, vettä ja energiaa kuin kasvipäeräinen ruoantuotanto. Maapallon viljelypinta-ala on kuitenkin rajallinen ja sen käyttömahdollisuudet heikkenevät jatkuvasti kuivuuden, eroosion ja ilmastomuutoksen myötä. Eläintuotannossa käytettäviä rehuja onkin pyrittävä tuottamaan uusilla, vaihtoehtoisilla lajeilla ja tavoilla.

Bakteerien ja hiivojen tuottama yksisoluproteiini (single cell protein) on eräs tulevaisuuden valkuaisrehuvaihtoehto. Mikrolevät eli planktonlevät ovat pääasiassa yksisoluisia, yleensä vedessä eläviä leviä ja bakteereita. Myös mikrolevien tuottaman valkuaisen katsotaan kuuluvan yksisoluproteiineihin. Mikrolevien raakavalikuaisen osuus onkin suuri, usein noin 500–700 g/kg kuiva-ainetta (ka). Mikrolevät sisältävät kuitenkin myös monia muita ravitsemuksellisesti arvokkaita yhdisteitä kuten lipidejä, vitamiineja, kivennäisaineita ja karotenoideja (Becker 2007). Lisäksi mikrolevien kasvu eroaa esimerkiksi hiivojen käymisreaktiosta, sillä mikrolevät yhteyttävät eli käyttävät kasvuunsa hiilidioksidia ja auringonvaloa ja tuottavat happea (Wageningen University and Research Centre 2013).

Mikrolevät ovat potentiaalinen tulevaisuuden valkuaisrehu, sillä niiden viljelyyn tarvitaan merkittävästi vähemmän pinta-alaa kuin tavanomaisten viljelykasvien viljelyyn. Tuotettua proteiinikiloa kohti mikrolevien kasvatusalaiden vaatima pinta-ala on 28 kertaa pienempi kuin esimerkiksi soijapavun viljelyyn tarvittava peltopinta-ala (Brune ym. 2009, Wijffels ym. 2010). Mikrolevän rehukäyttö kotieläinten ruokinnassa saattaa siten olla yksi ratkaisu globaaleihin ongelmiin, kuten peltopinta-alan rajallisuuteen ja ravinnon riittävyyteen (Ravinda ym. 2009, Ekmay & Lei 2012).

Eläintuotannon tehostuessa laadukkaat valkuaisrehut ovat välttämätön lisä turvaamaan eläinten kasvava tuotos ja lisääntynyt aminohappojen tarve. Esimerkiksi maidontuotannossa ruokinnan valkuaislisä mahdollistaa suuremman tuotoksen (Santos ym. 1998, Korhonen 2002a). Ilman eläimen tarvetta vastaavaa valkuaisrehua lypsylehmien geneettinen potentiaali maidontuotantoon jää mahdollisesti hyödyntämättä ja lisäksi optimaalinen valkuais täydennys takaa tuotannon taloudellisen kannattavuuden (Apelo ym. 2014). Laadukas valkuaisrehu ja eläimen kannalta optimaalinen aminohappokoostumus ovat tärkeitä tekijöitä myös vältettäessä valkuaisyliruokintaa (Huhtanen ym. 2011). Eläimen tarpeen ylittävä valkuaisruokinta tai aminohappokoostumukseltaan eläimen tarvetta vastaamaton valkuainen heikentää valkuaisen hyväksikäyttöä. Ylimääräisen valkuaisen typpi tulee erityyksi sontaan ja virtsaan ja aiheuttaa siten ympäristökuormitusta (Nousiainen 2004, Apelo ym. 2014).

Suomessa lypsylehmien käytetyimpiä valkuaisrehuja ovat mm. rypsi (*Brassica rapa* L. *oleifera*), rapsi (*Brassica napus* L. *Oleifera*) ja soiija (*Glycine max*). Näistä rypsiä ja rapsia viljellään Suomessa. Lisäksi Suomessa viljellään härkäpapua (*Vicia faba* L.) ja hernettä (*Pisum sativum* L.). Näiden osuus käytetystä rehuvalkuaisesta on kuitenkin toistaiseksi pieni. Suurin osa (n. 85%) Suomessa käytetystä valkuaisrehuista tuodaan ulkomailta. Tuontivalkuaisrehut ovat lähinnä soijaa sekä rypsiä ja rapsia. Näistä käytetyin on soiija (Huhtanen ym. 2011). Uusien valkuaisrehujen löytäminen on tarpeen, sillä niin kotimaisten kuin ulkomaisten valkuaisrehujen saatavuus ja hinta ovat tulevaisuudessa yhä epävarmempia tekijöitä. Esimerkiksi kotimaisen rypsin tuotantoala on ollut viime vuosina laskussa, myös satokautena 2014. Lisäksi rypsin ja rapsin viljelyalan kasvattamiseen on Suomen ilmasto-olosuhteissa rajalliset mahdollisuudet (Peltonen-Sainio ym. 2007, Luke 2015). Tuontisoijan saatavuuden riskeinä ovat muun muassa sen globaalisti kasvava kysyntä, soijantuotannon aiheuttamat ympäristöhaitat ja mahdollinen hinnannousu (Helsingin Sanomat 20.5.2014).

1.2 Mikrolevät

Mikrolevät ovat pääasiassa aitotumallisia yhteyttäviä yksisoluisia eliöitä. Mikroleviksi kutsutaan myös esitumallisia syanobakteereita. Luonnonvaraiset mikrolevät ovat tärkeitä vesistöjen ravintoketjun tuottajia ja ne tuottavat suuren osan maapallon biomassasta. Yhteyttäessään ne sitovat noin puolet ilmakehän hiilidioksidista ja ne vähentävät siten maapallon kasvihuonekaasuja. Luonnonvaraiset mikrolevät tuottavat myös noin puolet ilmakehän hapesta (Christaki ym. 2011, Wageningen University and Research Centre 2013).

Mikrolevät kasvavat nopeasti, tarvitsevat vain vähän ravinteita ja niiden tuottavuus pinta-alaa kohti on suuri. Mikrolevät tarvitsevat kasvuunsa auringonvaloa, hiilidioksidia, sopivan lämpötilan, veden suolapitoisuuden ja pH:n sekä pieniä määriä ravinteita kuten typpeä, fosforia ja kaliumia. Mikrolevien kasvuun tarvitsemien ravinteiden määrä vaihtelee mikrolevälajeittain, mutta kokonaisuudessaan määrät ovat erittäin vähäisiä verrattuna muihin viljelykasveihin (Brennan & Owende 2010, Mata ym. 2010).

Mikroleviä on käytetty ravintona jo vuosituhansia muuan muassa Kiinassa ja Tšad-järven alueella Afrikassa. Mikrolevien kaupallisen tuotannon katsotaan alkaneen noin 1960 -luvulla Japanissa. Nykyään mikroleviä kasvatetaan kaupallisesti maailmassa kymmeniä tuhansia tonneja vuodessa, josta kotieläinten rehuksi käytetään noin 30% (Spolaore ym. 2006). Kaupalliseen tarkoitukseen tuotettuja mikroleviä kasvatetaan avoimissa kasvatusaltaissa tai suljetuissa bioreaktoreissa. Suljettujen bioreaktorien etuna on, että ne tarjoavat steriilit kasvatusolosuhteet eivätkä ympäristöstä kulkeutuneen vieraslajit, bakteerit tai virukset pääse leviämään kasvustossa. Leväkasvuston lajien hallinta on tärkeää erityisesti silloin, kun mikrolevää tuotetaan rehuksi, sillä osa syanobakteereista tuottaa haitallisia toksiineja. Lisäksi bioreaktoreissa pystytään säätelemään mm. valon, pH:n ja ravinteiden pitoisuuksia tarkemmin kuin avoimissa kasvatusaltaissa ja ne soveltuvat myös alueille, joissa luonnonvalo tai lämpötila ei riitä kattamaan mikrolevien tarvetta (Brennan ja Owende 2010, Mata ym. 2010). Avoimissa kasvatusaltaissa tuotantokustannukset ovat alhaisemmat kuin bioreaktoreissa, mutta bioreaktoreissa tuotanto on huomattavasti tehokkaampaa. Mikrolevien

erityinen etu viljelykasveihin verrattuna on se, että kasvatusaltaat tai bioreaktorit voivat sijaita alueilla, jotka ovat esimerkiksi kuivuuden takia muuhun maatalouskäyttöön sopimattomia. Mikrolevien kasvatusta ei näin ollen kilpaile maatalasta muun ruoantuotannon kanssa (Mata ym. 2010).

Mikrolevien kasvatuksesta Suomessa on vain vähän käytännön kokemusta ja kaupallinen rehukäyttöön viljely vaatii vielä tuotantoprosessien kehittymistä. Mikrolevien kasvatuksen integrointi prosessiteollisuuteen on kuitenkin patentoitu BioA-konseptina *Bio Refine Tech - Biojalostamo-osaamisen ja liiketoiminnan kehittäminen* -hankkeessa (Cursor Oy 2014). BioA-konseptin pyrkimys kasvattaa mikroleviä sellutehtaiden lämpimissä ja ravinnepitoisissa suodosvesissä on maailmanlaajuisesti uusi ja toteutuessaan teollisuuden sivuvirtoja tehokkaasti hyödyntävä menetelmä (Jari Järvinen, henkilökohtainen tiedonanto 18.8.2015).

Mikroleviä voidaan kasvattaa moneen tarpeeseen, kuten biopolttoaineiden raaka-aineeksi tai lannoitteeksi ja niitä voidaan hyödyntää jätevesien puhdistuksessa. Biopolttoaineeksi kasvatetusta mikrolevästä käytetään polttoaineen valmistukseen levän lipidejä. Jäljelle jäävä biomassa sisältää mm. mikrolevän valkuaisen, ja sen hyödyntäminen kotieläinten rehuna on mahdollista (Drewery ym. 2012). Yksinomaan biopolttoaineen tuottaminen mikrolevästä ei tällä hetkellä ole taloudellisesti kannattavaa. Mikäli jäljelle jäävä biomassa käytettäisiin kotieläinten rehuna, olisivat tuotannon taloudelliset mahdollisuudet suuremmat. Wiffels ym. (2010) ovat esittäneet, että kaupallisesti tuotetun mikrolevän kaikki komponentit tulisi hyödyntää, jotta mikrolevän tuotanto olisi taloudellisesti kannattavaa.

1.3 Mikrolevien kemiallinen koostumus

Mikrolevien kemiallisessa koostumuksessa on suurta vaihtelua lajeittain. Pääpiirteissään voidaan kuitenkin sanoa, että mikrolevät sisältävät runsaasti raakavalkuaista (rv), usein 500–700 g/kg ka, hiilihydraatteja 100–200 g/kg ka ja lipidejä 50–200 g/kg ka (Becker 2007). Mikrolevien kemiallista koostumusta tarkastellessa on huomioitava, että raakavalkuaispitoisuus yliarvioi mikrolevien

valkuaispitoisuutta, sillä mikrolevien muiden tyyppä sisältävien ainesosien osuus on suuri, esimerkiksi *Spirulina platensis* -mikrolevässä 11,5% (Becker 2007). Ei-valkuais-tyypen määrään vaikuttaa erityisesti mikrolevien suuri nukleiinihappopitoisuus. Taulukossa 1 on esitetty eräiden mikrolevälajien koostumus Beckerin (2007) mukaan.

Taulukko 1. Eräiden mikrolevälajien kemiallinen koostumus (Becker 2007).

Mikrolevälaji	Raakavalkuainen g/g ka	Hiilihydraatit g/kg ka	Lipidit g/kg ka
<i>Arthrospira maxima</i>	600–710	130–160	60–70
<i>Chlorella vulgaris</i>	510–580	120–170	140–220
<i>Scenedesmus obliquus</i>	500–560	100–170	120–140
<i>Spirulina platensis</i>	460–630	80–140	40–90

Mikrolevien aminohappo- ja rasvahappokoostumus on ihmis- ja eläinravitsemuksen kannalta hyvä (Becker 2007). Aminohappokoostumukseltaan ne ovat verrattavissa perinteisiin kasvikunnan valkuaisen lähteisiin, kuten soijaan. Taulukossa 2 on verrattu eräiden mikrolevälajien aminohappokoostumusta kotimaisissa lypsylehmien ruokintakokeissa käytettyyn soijaan (Korhonen ym. 2002a) ja rypsiin (Korhonen ym. 2002b). Mikrolevät sisältävät usein runsaasti mm. lysiniä ja metioniina, jotka ovat tärkeitä aminohappoja kotieläinten ruokinnassa (McDonald ym. 2011). Sen sijaan mikrolevät sisältävät jonkin verran vähemmän histidiiniä kuin esimerkiksi rypsi ja soija (taulukko 2). Histidiinin on osoitettu olevan maidontuotantoa ensimmäisenä rajoittava aminohappo nurmisäilörehuun pohjautuvissa ruokinnoissa (Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000, Huhtanen ym. 2002a).

Taulukko 2. Mikrolevien, rypsin ja soijan välttämättömien aminohappojen koostumus (g/kg raakavalkuaista) (Becker 2007).

	Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Fen	Tre	Try	Val
<i>Arthorspira maxima</i>	6,5	1,8	6,0	8,0	4,6	1,4	4,9	4,6	1,4	6,5
<i>Chlorella vulgaris</i>	6,4	2,0	3,8	8,8	8,4	2,2	5,0	4,8	2,1	5,5
<i>Scenedesmus obliquus</i>	7,1	2,1	3,6	7,3	5,6	1,5	4,8	5,1	0,3	6,0
<i>Spirulina platensis</i>	7,3	2,2	6,7	9,8	4,8	2,5	5,3	6,2	0,3	7,1
Soija (Korhonen ym. 2002a)	7,4	2,8	4,7	8,1	6,6	1,4	5,3	4,0	-	5,0
Rypsi (Korhonen ym. 2002b)	6,0	2,7	3,8	6,8	5,3	2,0	4,3	4,3	-	5,0

Arg=arginiini, His=histidiini, Ile=isoleusiini, Leu=leusiini, Lys=lysiini, Met=metioniini, Fen=fenyyialaniini, Tre=treoniini, Try=tryptofaani, Val=valiini

Mikrolevien lipidien osuus sekä rasvahappokoostumus vaihtelevat suuresti mikrolevälajeittain, mutta lisäksi mikrolevien kasvuolosuhteet ja kasvun aikaiset ravinteiden määrä ja laatu vaikuttavat lipidien määrään ja koostumukseen (Becker 2004). Taulukossa 3 on verrattu eräiden mikrolevälajien rasvahappokoostumusta soijaan ja rypsiin. Yleisimpiä mikrolevien rasvahappoja ovat palmitiinihappo (16:0), steariinihappo (18:0), öljyhappo (18:1n-9), linolihappo (18:2n-6) ja alfa-linoleenihappo (18:3n-3). Useat mikrolevälajit sisältävät runsaasti monityydyttymättömiä rasvahappoja (Hempel ym. 2012). Mikrolevät ovat *omega* 3 -rasvahappojen lähteenä pidettyjen kalojen ja kalaöljyn alkuperäinen lähde, sillä kalat eivät syntetisoi *omega*-rasvahappoja vaan ne ovat kaikki peräisin mikrolevistä (Stamey ym. 2012). Mikrolevälaji *Spirulina platensis* sisältää runsaasti gammalinoleenihappoa (18:3n-6, GLA) (Ötles & Pire 2001).

Taulukko 3. Mikrolevien rasvahappokoostumus (Ötles & Pire 2001).

g/100g rasvahappoja	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Rypsi (Zambiazi ym. 2007)	Soija (Zambiazi ym. 2007)
8:0	3,72	0,26	-	-
12:0	0,84	0,87	-	-
14:0	-	0,69	0,06	0,06
15:0	0,70	1,70	-	-
16:0	42,3	14,4	3,75	9,91
17:0	0,45	0,12	0,04	0,10
18:0	0,95	1,57	1,87	3,94
18:1n-9	1,97	17,6	62,4	21,4
18:2n-6	16,2	12,0	20,1	56,0
18:3n-6	20,1	-	-	-
18:3n-3	-	15,8	8,37	7,15
20:0	-	0,14	0,64	0,41
20:2n-6	0,94	-	-	-
22:6	-	0,30	-	-
Tyydyttyneitä	51,6	25,3	6,98	15,1
Kertatyydyttymättömiä	5,88	28,0	64,4	21,7
Monityydyttymättömiä	39,5	38,3	28,6	63,2

1.4 Mikrolevien käyttö kotieläinten ruokinnassa

Mikrolevien käyttöä kotieläinten ruokinnassa on tutkittu 1950-luvulta lähtien. Tutkimuksen kohteena on pääsääntöisesti ollut mikrolevän käyttö ruokinnan lisäravintoaineena ja sen vaikutus maidon, kananmunien ja lihan ravitsemukselliseen laatuun, erityisesti niiden rasvahappokoostumukseen. Mikrolevien käyttöä kotieläinten valkuaisrehuna on sen sijaan tutkittu vähemmän. Runsaan raakavaluapitoisuuden ansioista mikrolevät ovat kuitenkin potentiaalinen vaihtoehto korvaamaan tavanomaisia valkuaisrehuja kotieläinten ruokinnassa (Becker 2007). Mikrolevien ravitsemuksellisesti hyvä aminohappo- ja rasvahappokoostumus tukee niiden käyttöä kotieläinten rehuna.

Mikrolevän rehukäyttöä märehitijöillä on tutkittu jonkin verran, mutta tutkimuksissa on keskitytty maidon rasvahappokoostumuksen muutoksiin mikroleväruokintoissa. Aikaisemmissa tutkimuksissa on tarkasteltu muun muassa mikroleväruokintojen vaikutusta maitorasvan monityydyttymättömien rasvahappojen, erityisesti DHA:n (dokosaheksaenihappo, 22:6n-3) ja EPA:n

(eikosapentaeenihappo, 20:5n-3) pitoisuuksiin (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008; Stamey ym. 2012).

Mikroleväruokintojen vaikutukset märehitijöiden kuiva-aineen syöntiin ovat olleet osassa tutkimuksia syöntiä vähentäviä (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008). Aina syönti ei kuitenkaan ole vähentynyt (Stamey ym. 2012, Wullepit ym. 2012). Mikrolevää käyttäneissä ruokintakokeissa mikrolevän monityydyttymättömien rasvahappojen osuus on usein ollut suuri (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Stamey ym. 2012). Monityydyttymättömien, erityisesti C20-rasvahappojen tiedetään vähentävän märehitijöiden kuiva-aineen syöntiä (Donovan ym. 2000, Shingfield ym. 2007). Pitkäketjuiset, monityydyttymättömät rasvahapot ovat pötsimikrobeille myrkyllisiä ja häiritsevät siten pötsifermentaatiota ja haittaavat kuidun sulatusta (Coppock & Wilks 1991, Donovan ym. 2000). Lisäksi mikrolevien maittavuutta on pidetty mahdollisena kuiva-aineen syöntiä vähentävänä tekijänä märehitijöillä (Drewery ym. 2012). Mikrolevien heikko maittavuus voikin mahdollisesti rajoittaa niiden valkuaisrehukäyttöä märehitijöillä.

Maitotuotos on erilaisia mikroleviä käyttäneissä tutkimuksissa pysynyt usein mikroleväruokinnoissa ennallaan (Franklin ym. 1999, AbuGhazaleh ym. 2009, Christaki ym. 2012, Stamey ym. 2012). Myös maidon valkuaispitoisuus on pysynyt mikroleväruokinnoissa ennallaan (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, AbuGhazaleh ym. 2009, Stamey ym. 2012). Sen sijaan maitorasvan osuus on vähentynyt mikroleväruokinnoissa osassa tutkimuksista (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Wullepit ym. 2012). Maitorasvan osuuden väheneminen on yhteydessä käytetyn mikrolevän runsaaseen monityydyttymättömien rasvahappojen määrään. Runsaan monityydyttymättömien rasvahappojen saannin, esimerkiksi kasvi- tai kalaöljyvalmisteiden käytön märehitijöiden ruokinnassa, tiedetään aiheuttavan maidon rasvapitoisuuden merkittävää vähenemistä eli maitorasvan depressiota. Ilmiön taustalla on pötsissä tapahtuva biohydrogenaatio, jossa pötsimikrobit muokkaavat märehitijän rehun monityydyttymättömät rasvahapot tyydyttyneemmiksi. Biohydrogenaatiossa rasvahappojen kaksoissidoksellisiin hiiliin liittyy vetyä, jolloin ne muokkaantuvat usein erilaisten *trans*-sidoksellisten välituotteiden kautta tyydyttyneiksi rasvahapoiksi. Paljon monityydyttymättömiä rasvahappoja sisältävä dieetti

aiheuttaa biohydrogenaation väli- ja lopputuotteiden kertymistä elimistöön. Pitkäketjuisten rasvahappojen, erityisesti *trans*-biohydrogenaatiotuotteiden kuten *trans*-10 *cis*-12 18:2 CLA:n, tiedetään inhiboivan maitorasvan synteesiä maitorauhasessa (Shingfield ym. 2007).

Tutkimuksissa, joissa on tarkasteltu mikrolevän vaikutusta märehtijöiden kuiva-aineen syöntiin, maitotuotokseen tai maidon pitoisuuksiin, ovat käytetyt mikrolevämäärät olleet yleensä pieniä. Esimerkiksi Christaki ym. (2012) käyttivät *Spirulina spp.* mikrolevää 40 g päivässä ja AbuGhazaleh ym. (2009) *Schizochytrium spp.* mikrolevää 50 g–150 g päivässä. Stamey ym. 2012 lisäsivät mikroleväkäsittelyihin ”Gold Value Fat”-valmistetta (Marteck Biosciences Corporation, Columbia, MD) 150 g–300 g päivässä ja Boeckert ym. (2008) *Schizochytrium spp.* mikroleväjaista DHA-rikastettua ”DHA Gold” -valmistetta (Marteck Biosciences Corporation, Columbia, MD) 43 g syötyä kuiva-ainekilogrammaa kohti. Toisaalta myös suurempia määriä on käytetty, esimerkiksi Or-Rashid ym. (2008) tutkimuksessa lehmät saivat 55 % *Cryptocodinium cohnii* mikrolevää sisältävää pellettä 1,1 kg–4,2 kg ka päivässä.

Aikaisemmissa tutkimuksissa käytetyt mikrolevävalmisteet ovat usein olleet DHA-rikastettuja erikoisvalmisteita, joiden DHA-pitoisuus on ollut jopa 198 g DHA/kg ka (Boeckert ym. 2008). Tällaiset lisäravintoaineiden käyttö ei vastaa mikrolevän käyttöä valkuaisrehuna. Lisäksi aikaisemmissa tutkimuksissa mikrolevä on yleensä annosteltu kontrollidieetin lisäksi tai sillä on korvattu seosrehudieettiä kokonaisuudessaan. Esimerkiksi Franklin ym. (1999) korvasivat mikrolevällä seosrehudieettiä 910 g verran, Or-Rashid ym. (2008) korvasivat sinimailas-olki seosta 500 g–2 kg. Stamey ym. (2012) käyttivät mikrolevää lisäravinteena ja Christaki ym. (2012) lisäsivät 40 g *Spirulina platensis* -mikrolevää perusdieettiin.

Mikrolevien käyttöä märehtijöiden valkuaisrehuna ei kuitenkaan ole tutkittu juuri lainkaan. Jonkin verran on tutkittu mikrolevien valkuaisrehukäyttöä yksimahaisilla kotieläimillä. Esimerkiksi Venkataraman ym. (1994) korvasivat *Spirulina platensis* -mikrolevällä kalajauhoa ja maapähkinäpuristetta ja Raach-Moujahed ym. (2011) 1–5 % maissi-soijadieettiä broilereiden ruokinnassa. Kummassakaan tutkimuksessa mikrolevää saaneiden broilereiden kasvu ei

heikentynyt. Yap ym. (1982) korvasivat suuria määriä (max. 33 %) soijarouheesta 8-26 päivän ikäisten porsaiden dieetistä *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima* ja *Chlorella sp* -mikrolevillä. Grinstead ym. (2000) korvasivat pieniä määriä (2–20 g/kg ka) soijarouhetta *Spirulina platensis* -mikrolevällä vieroitettujen lihasikojen ruokinassa pitäen dieetin lysiinipitoisuuden vakiona. Mikroleväruokinnan vaikutukset sikojen kasvuun ovat olleet näissä tutkimuksissa pieniä, mutta lisättäessä mikrolevän osuutta yli 14 % (Yap ym. 1982) sikojen kasvu heikkeni. Henman (2012) raportoi vieroitettujen lihasikojen ruokintakokeesta, jossa korvattiin 10 % rypsirouheesta usean eri mikrolevälajin seoksella. Tutkimuksessa sikojen kasvu oli mikroleväruokinnoissa heikompa, johtuen todennäköisesti lysiniin ja metioniinin pienemmästä osuudesta käytetyssä mikroleväseoksessa kuin kontrollirehu rypsisissä.

Yksimahaisilla kotieläimillä mikrolevien rehukäyttöä hankaloittaa mikrolevien huono sulavuus muun muassa selluloosaa sisältävän soluseinämäaineen ja suuren nukleiinihappopitoisuuden vuoksi (Becker 2004, Skrede ym. 2011). Ekmay ja Lei (2012) ovat esittäneet, että enintään noin 10 % broileriden ja sikojen valkuaisruokinnasta voitaisiin korvata mikrolevällä ilman että eläinten kasvu heikentyy. Märehtijöillä tehtyjä sulavuuskokeita tai sulavuutta tarkastelevia tutkimuksia mikroleväruokinnoilla on hyvin vähän. Becker (2004) raportoi Ganowskin ym. (1975) tutkimuksesta, jossa vasikoiden ruokintaan lisätty *S. obliquus* -mikrolevä ei heikentänyt sulavuutta kolme viikkoa kestäneen kokeen aikana. Uudempaa tutkimusta on Lodge-Ivey ym. (2014) *in vitro*-menetelmällä toteutettu sulavuustutkimus, jossa käytettiin *Nannochloropsis spp.* ja *Chlorella spp.* mikrolevälajeja. Tutkimuksen johtopäätöksenä todettiin, että mikrolevä on lupaava rehu märehtijöille.

Yksimahaisten ruokintakokeissa käytetty mikrolevä on toisinaan ollut biopolttoainetuotannon jäännösbiomassaa, joka sisältää poikkeuksellisen suuria tuhkapitoisuuksia, jopa 45% (Austic ym. 2013). Austicin ym. ruokintakokeessa broilereilla mikrolevän 45% tuhkapitoisuus aiheutti mm. löysää ulostetta. Lodge-Ivey ym. (2014) pohtivat tutkimuksessaan jäännösbiomassan suuren tuhkapitoisuuden vaikuttavan mahdollisesti negatiivisesti ravintoaineiden imeytymiseen ja hyväksikäyttöön myös märehtijöillä. Myös yksittäisten

mikroravinteiden kuten raudan, kuparin tai alumiinin suuret pitoisuudet voivat olla haitallisen suuria mikrolevästä valmistetun biopolttoaineen sivutuotteissa. Käytettäessä mikrolevää kokonaisuudessaan rehuksi, on tuhkan osuus ollut yleensä vastaava kuin tavanomaisissa rehuissa (Franklin ym. 1999, Skrede ym. 2011).

1.5 Tutkielman tavoitteet

Tämän tutkielman tavoitteena on selvittää, voidaanko mikrolevällä korvata lypsylehmien valkuaisrehuna käytettävää rypsiä. Tutkielmassa tarkastellaan miten rypsin korvaaminen osittain tai kokonaan mikrolevällä vaikuttaa lypsylehmien kuiva-aineen syöntiin, ravintoaineiden sulavuuteen, plasman aminohappojen ja aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksiin, maitorauhasen aineenvaihduntaan sekä maitotuotoksiin, maidon pitoisuuksiin ja maidon rasvahappokoostumukseen.

Tutkimuksen hypoteesina oli, että mikrolevä maittaa heikommin kuin rypsi, jonka vuoksi lypsylehmien kuiva-aineen syönti jää vähäisemmäksi mikrolevää sisältävillä ruokinnoilla. Tutkimuksen toinen hypoteesi oli, että mikrolevä sisältää vähemmän histidiiniä kuin rypsi, ja sen vuoksi maito- ja valkuaisuotokset jäävät mikroleväruokinnoissa pienemmiksi kuin käytettäessä valkuaisrehuna rypsiä.

Tutkielma kuuluu *Algae Foods –Levän uudentyyppinen hyödyntäminen* -projektiin ja sen ensimmäiseen ruokintakokeeseen. Projekti on Euroopan aluekehitysrahaston (EAKR) ja Raisioagron rahoittama, ja se on toteutettu yhteistyössä Cursor Oy:n, Kotkan-Haminan seudun kehittämisyrityksen kanssa.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1. Koeasetelma ja koeruokinnat

Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa 10.8.2013–12.10.2013. Kokeessa oli mukana kuusi ayrshirelehmää, joista kahdella oli

pötsifisteli (taulukko 4). Lehmät olivat vähintään 2–7 kertaa poikineita ja niiden poikimisesta oli kokeen alkaessa keskimäärin 212 päivää (keskiarvon keskivirhe 13 päivää). Lehmät painoivat kokeen alussa keskimäärin 666 kg (keskiarvon keskivirhe 12,3 kg). Lehmät olivat kokeen ajan kytkettyinä parteen.

Kokeen malli oli kaksinkertainen 3 x 3 latinalainen neliö. Mallissa kuusi lehmää oli jaettu kahteen neliöön siten, että molemmissa neliöissä oli kolme lehmää. Fistelöidyt lehmät olivat neliössä 1. Koemalli sisälsi kolme jaksoa, joiden aikana jokainen lehmä kävi läpi kaikki kolme koeruokintaa. Jokaisella jaksolla kummassakin neliössä yksi lehmä oli yhdellä kolmesta koeruokinnasta (taulukko 5). Jakson pituus oli kolme viikkoa, joista kaksi ensimmäistä oli totutuskautta (jakson päivät 1.–14.) ja kolmas keruukausi (jakson päivät 15.–21.).

Taulukko 4. Kokeessa mukana olleet lehmät.

Neliö 1			
Nro	Eläin	Poikimakerta	Poikimapäivä
1	583 Alibi (Fistelöity)	3	29.1.2013
2	560 Ässämix (Fistelöity)	4	23.12.2012
3	600 Estrella	2	21.2.2013
Neliö 2			
Nro	Eläin	Poikimakerta	Poikimapäivä
4	605 Extacia	2	18.12.2012
5	449 Tenkapoo	7	4.12.2012
6	439 Tavernassa	7	29.1.2013

Taulukko 5. Lehmäkohtaiset koeruokinnat jaksoittain.

Jakso	Aika	Neliö 1			Neliö 2		
		583 Alibi	560 Ässämix	600 Estrella	605 Extacia	449 Tenkapoo	439 Tavernassa
1	10.8.–30.8.	Levä0	Levä1	Levä2	Levä0	Levä1	Levä2
2	31.8.–20.9.	Levä2	Levä0	Levä1	Levä2	Levä0	Levä1
3	21.9.–12.10.	Levä1	Levä2	Levä0	Levä1	Levä2	Levä0

Koeruokintojen tutkittavana tekijänä oli mikroleväjauho (Duplaco B. V., Hengelo Alankomaat). Mikroleväjauho oli mikrolevien *Spirulina platensis* (tästä eteenpäin *Spirulina*) ja *Chlorella vulgaris* (tästä eteenpäin *Chlorella*) 1:1 seosta. Koeruokintoja oli kolme. Kontrolliruokinnalla ("Levä 0") lehmien valkuaisrehuna oli rypsi (ilmakuivana 2,3 kg/pv) (Rypsiitiviste, A-Rehu Oy, Seinäjoki, Suomi). Ruokinnalla "Levä 1" rypsiä korvattiin puolet *Spirulinan* ja *Chlorellan* seoksella (0,5 kg/pv) ja ruokinnalla "Levä 2" rypsi korvattiin mikroleväjauholla (1,0 kg/pv) kokonaan. Valkuaisruokinnat olivat isonitrogeenisia eli mikroleväjauhon valkuaismäärä korvasi rypsin valkuaisen. Kaikkien lehmien väkirehu sisälsi valkuaisrehun lisäksi vilja-leikeseosta (Vilja-leikeseos, A-Rehu Oy, Seinäjoki, Suomi), jonka määrä laskettiin siten, että väkirehun kokonaismäärä pysyi samana (11 kg/pv) kaikilla ruokinnoilla. Lisäksi lehmät saivat kivennäisseosta 250 g/pv (Pihatto-Melli Plus, Raisioagro Oy, Raisio, Suomi).

Säilörehua lehmät saivat vapaasti koko kokeen ajan siten, että jätettä jäi vähintään 5% annetusta säilörehun määrästä. Säilörehu oli pyöröpaaleihin korjattua (13.6.2013) ensimmäisen sadon timotei-nurminatarehua. Säilöntäaineena oli natriumnitriittiä ja heksamiinia sisältävä AgroSil Liquid 5,81 l/tn (WK Agro Oy, Jorvas, Suomi).

2.2 Rehujen jako

Ruokittaessa mikroleväjauho sekoitettiin ensin veteen ja sen jälkeen mikroleväseos sekoitettiin väkirehuannoksen muihin komponentteihin. Mikrolevän annostusta lisättiin jokaisen jakson alussa vähitellen siten, että annosta lisättiin säännöllisin lisäyksin päivittäin viikon ajan saavuttaen ensimmäisen totutusviikon jälkeen täysi annos. Lisäksi ensimmäisellä totutusviikolla rehun joukkoon lisättiin Farmarin seosmelassia (Suomen rehu, Hankkija Oy, Hyvinkää, Suomi) 50-100 ml, joka jätettiin pois ensimmäisen viikon jälkeen. Väkirehu jaettiin neljä kertaa päivässä (klo 6, 11, 17, 19.30) rehukaukaloön erikseen ripustettavista väkirehukupeista. Mahdollinen väkirehujäte kirjattiin kerran päivässä aamuruokinnan jälkeen. Mahdollisesta väkirehujätteestä kerättiin näyte lehmittäin jokaisen jakson viimeisen viikon aikana.

Säilörehu jaettiin käsin kolmesti päivässä (klo 9, 14, 18). Jaettava säilörehumäärä kirjattiin jokaisella jakokerralla. Edellisen päivän säilörehutähteiden poiskorjaus tehtiin päivittäin ennen ensimmäistä säilörehunjakoja ja jäännöksen määrä kirjattiin ylös. Rehunkulutus laskettiin vähentämällä jäännös jaetusta rehumäärästä.

2.3 Näytteiden keruu

2.3.1 Elopaino

Eläimet punnittiin kokeen alussa kahtena peräkkäisenä päivänä ja sen loputtua kahtena peräkkäisenä päivänä samaan aikaan lehmävaa'alla. Punnituksen tuloksista laskettiin keskiarvo.

2.3.2 Rehut

Säilörehusta määritettiin pH kerran viikossa koko kokeen ajan. Keruuviikolla kerättiin päivittäin näytettä kaikilta rehunjakokerroilta. Säilörehusta analysoitiin jaksoittain primaarinen ja sekundaarinen kuiva-aine, pH, tuhka, raakavalkuainen, neutraalidetergenttikuitu (NDF), maitohappo, haihtuvat rasvahapot, pelkistävät sokerit, ammoniumtyppi, etanoli, aminohapot, pitkäketjuiset rasvahapot, *in vitro* – sellulaasisulavuus, happoon liukenematon tuhka (AIA) ja sulamaton NDF (iNDF).

Väkirehun vilja-leikkeestä, rypsistä ja levistä kerättiin keruuviikolla jokaisesta näytettä. Väkirehusta analysoitiin jaksoittain primaarinen ja sekundaarinen kuiva-aine, tuhka, kokonaisrasva, raakavalkuainen, aminohapot, NDF, pitkäketjuiset rasvahapot, AIA ja iNDF. Kivennäisseoksesta kerättiin yksi yhdistelmänäyte koko kokeen ajalta ja siitä määritettiin primaarinen kuiva-aine, tuhka ja AIA.

2.3.3 Maitotuotos ja maidon koostumus

Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä klo 6 ja 17 putkilypsykoneella (DelPro, DeLaval, Tumba, Ruotsi). Maitomäärä mitattiin jokaisella lypsykerralla (Tru-Test, Auckland, Uusi-Seelanti) ja tulokset raportoitiin keruuviikon näytteistä. Maidosta kerättiin näytteet jokaisen jakson keruuviikolla neljältä peräkkäiseltä lypsykerralta (jakson 18.-20. päivä) ja ne analysoitiin lypsykerroittain. Näytteet säilöttiin Bronopol-pillerillä ja lähetettiin Valion Seinäjoen laboratorioon analysoitavaksi. Näytteistä määritettiin rasva, valkuainen, laktoosi, urea ja solut. Maidon rasvahapot analysoitiin pakastetusta (-20°C) suhteellisesta näytteestä.

2.3.4 Pötsinäytteet

Jokaisen jakson keruuviikolla, jakson 19. päivänä, otettiin neliön 1 kahdelta fistelöidyltä lehmältä pötsinesteestä näyte juuri ennen aamuruokintaa klo 6 ja siitä säännöllisin väliajoin klo 16.30 saakka (7.30, 9.00, 10.30, 12.00, 13.30, 15.00 ja 16.30). Pötsineste suodatettiin yksinkertaisen harsokankaan läpi. Suodoksesta mitattiin välittömästi pH (S20 SevenEasy, Mettler-Toledo Ltd, Greifensee, Sveitsi). Suodoksesta otettiin 10 ml osanäyte alkueläinten laskentaa varten. Näytteeseen lisättiin 30 ml 10% (v/v) formaldehydiä laimennettuna fysiologiseen 0,9% (w/v) suolaliuokseen. Alkueläinnäyte kerättiin samaan pulloon (500ml) lehmittäin ja säilytettiin jääkaapissa. Alkueläimet värjättiin metyyliivihreä-värjäysliuoksella ja laskettiin mikroskoopilla Fuchs-Rosenthal laskukammiolla (Horsham, PA, Yhdysvallat).

Pötsinäytteestä analysoitiin haihtuvat rasvahapot (VFA), joiden määrittystä varten 25 ml näytepulloon pipetoitiin 0,5 ml kyllästettyä elohopeakloridia, 5 ml pötsinestesuodosta, ja 2 ml 1N natriumhydroksidia (NaOH), jonka jälkeen näyte pakastettiin välittömästi (-20°C). Näytteen etikka-, propioni-, voi-, isovoi-, kaprioni-, valeriaana- ja isovaleriaanahapot analysoitiin jokaiselta näytteenottoajankohdalta erikseen.

Lisäksi pötsinäytteestä analysoitiin ammoniumtyppi, jonka määrittystä varten 25 ml näytepulloon pipetoitiin 0,3 ml 50% rikkihappoa (H_2SO_4) ja 15 ml pötsinestesuodosta. Näyte pakastettiin välittömästi (-20°C).

2.3.5 Verinäytteet

Verinäyte otettiin häntä- ja maitosuonesta jokaisen jakson keruuviikon viimeisenä päivänä (jakson 21. päivä). Verinäytteitä otettiin kolme kertaa päivän aikana (klo 5.30, 8.30, 11.30). Näytteitä otettiin kummastakin verinäytteenottopaikasta 3 vakuumiputkellista (3 x 10 ml) per kerta (2 etyleenidiamiinitetraetikkahappoputkea (EDTA) ja 1 hepariiniputki). Näytteenoton jälkeen putket pidettiin jäissä näytteiden jatkokäsittelyyn saakka. Näytteenottoaikojen yli yhdistetyistä plasmanäytteistä määritettiin glukoosi, insuliini, vapaat rasvahapot (NEFA), beetahydroksivoihappo (BHBA), etikkahappo ja aminohapot.

2.3.6 Sontanäytteet

Sontanäytteet kerättiin spot-näytteinä kokeen kaikilta lehmillä jokaisen jakson keruuviikolla viitenä peräkkäisenä päivänä (jakson 17.-20. päivä) aamulla ja iltapäivällä suoraan peräsuolesta. Sontanäytteet kerättiin jaksoittain ja lehmittäin astioihin, jotka säilytettiin koko jakson ajan pakastimessa. Sonnasta analysoitiin primaarinen ja sekundaarinen kuiva-aine, tuhka, NDF, AIA, iNDF sekä typpipitoisuus.

2.4 Kemiaalliset analyysit

Keruuviikolla kerätyistä ja pakastetuista rehu- ja sontanäytteistä valmistettiin analyysinäytteet ja ne analysoitiin maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa. Myös veri-, pötsineste- ja maidonrasvahappoanalyysit suoritettiin maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa. Analyysinäytettä valmistettaessa sulatettu rehu- ja sontanäyte kuivattiin tuulettavassa kuivauskaapissa ensin 1h 100°C lämmössä ja sen jälkeen rehut 50°C , sonnat 70°C

lämmössä kahden vuorokauden ajan. Kuivatut näytteet jauhettiin KT-sakomyllyllä (Koneteollisuus Oy, Klaukkala, Suomi), rehut 1,0 mm ja sonnat 1,5 mm seulalla.

Primaarinen kuiva-aine määritettiin sulatetusta rehu- ja sontanäytteestä, joka kuivattiin yhden vuorokauden ajan lämpökaapissa 100°C lämmössä. Sekundaarinen kuiva-aine määritettiin vastaavasti analyysinäytteestä. Näytteiden tuhka määritettiin analyysinäytteestä polttamalla sitä muhveliuunissa, 600°C lämpötilassa 16 tunnin ajan. NDF-kuitu määritettiin analyysinäytteestä Van Soestin ym. (1991) mukaan kuuma- ja kylmäuuttolaitteella (Tecator Fibertec System 1020 hot extractor ja 1021 cold extractor, FOSS, Hillerød, Tanska). Raakavalkuainen määritettiin analysoimalla typpipitoisuus Kjeldahl –menetelmällä (AOAC 1995). Tämän jälkeen raakavalkuaispitoisuus laskettiin kertomalla luvulla 6,25 (säilörehu, sonta, väkirehut)

Haihtuvat rasvahapot ja rehujen aminohapot määritettiin nestegromatografilla (Acquity UPLC, Waters, Yhdysvallat). Etanolin määrittämiseen käytettiin entsyymikittiä (cat. No 176 290, Boehringer Mannheim, Saksa) ja spektrofotometriä (Shimadzu UV mini 1240, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Saksa). Spektrofotometriä käytettiin myös maitohapon, pelkistävien sokereiden eli vesiliukoisten hiilihydraattien (Somogyi 1945, Salo 1965) ja ammoniumtyypen (McCulloughin menetelmä 1967) määrittämiseen. Tärkkelyspitoisuus määritettiin Salon ja Salmen (1968) mukaan. *In vitro*-sulavuus määritettiin Friedelin (1990) sellulaasi-pepsiinimenetelmällä Nousiaisen ym. (2003) muunnelmää käyttäen. Kokonaisrasva määritettiin petroleetteriuuttoon yhdistetyllä HCl-hydrolyysillä (FOSS Soxtec 8000, Sox Cap 20471, Hillerød, Tanska) (Euroopan Komissio 2009).

Säilörehun ja pötsin pH:n määrittämiseen käytettiin pH-mittarilla (S20 SevenEasy, Mettler-Toledo Ltd, Greifensee, Sveitsi) ja mittaus suoritettiin navettalaboratoriossa välittömästi näytteenoton jälkeen.

Lipidien uutto kylmäkuivatuista rehuista, esteröityjen lipidien transmetylaatio ja vapaiden rasvahappojen metylointi rasvahappojen metyyliestereiksi tehtiin Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2013a) mukaan. Maidon lipidien uutto ja metylointi tehtiin Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. (2011) mukaan.

Rasvahappojen metyyliesterit analysoitiin vetyliekki-ionisaatiodektoirilla varustetulla kaasukromatografilla (Hewlett-Packard 5890, Wilmington, Yhdysvallat), automaattinen näytteensyöttölaite Hewlett-Packard 7672A ja kapillaarikolonne (CP-Sil 88, 100 m × 0.25 mm × 0.20 µm, Chromopack 7489, Middelburg, Alankomaat). Kantokaasuna oli helium (injektiotilavuus 1 µl, heliumin paine ajon aikana 5 bar, split-suhde 1:40, lämpötilaohjelma: 70°C (2 min), 30°C/min, 170 °C (54 min), 30°C/min, 220 °C (40 min)). Injektorin lämpötila oli 240°C ja dektektorin 260°C. Piikit tunnistettiin kaasukromatogrammeista standardin (GLC 463, Nu-Chek-Prep, INC, Elysian, Yhdysvallat) ja retentioaikojen avulla.

2.5 Tulosten laskeminen ja tilastolliset menetelmät

Tilastolliset analyysit laskettiin jokaisen jakson viimeisen seitsemän päivän (keruuviiikko) tuloksista.

Säilörehun kuiva-aineen korjaukseen käytettiin Porter ym. 1984 laskukaavaa:
säilörehun korjattu kuiva-aine = $a + 0,41 * b + 0,89 * (c + d + e) + 1,00 * f$

jossa a= säilörehun primaarinen kuiva-aine, b= maitohappo-% tuoreessa, c= etikkahappo-% tuoreessa, d= propionihappo-% tuoreessa, e= voihamppo-% tuoreessa, f= ammoniumtyppi-% tuoreessa säilörehussa.

Ravintoaineiden sulavuudet on laskettu käyttäen merkkiaineena AIA:ta. Kuiva-aineen, orgaanisen aineen ja raakavalkuaisen näennäinen sulavuus sekä NDF:n sulavuus laskettiin kaavalla:

sulavuus = $(\text{pitoisuus rehussa} - \text{pitoisuus sonnassa}) / \text{pitoisuus rehussa}$

Energiakorjattu maitotuotos (EKM) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) mukaan.

Orgaaninen aine rehussa ja sonnassa laskettiin kuiva-aineen ja tuhkan erotuksena.

Rehuista saatava energia (MJ/pv) on laskettu kahdella kaavalla. Muuntokelpoisen energian¹ saanti (ME¹) laskettiin kaavalla:

$0,016 \times \text{rehuannoksen D-arvo (MAFF 1975)},$

jossa D-arvo=sulava orgaaninen aine kuiva-aineessa (g/kg) määritettynä rehujen ja sonnan merkkiainepitoisuuksien avulla.

ME² laskettiin kaavalla:

$\sum \text{rehun ka-syönti} \times \text{rehun energiasisältö MJ (g/kg)} - (-56,7 + 6,99 \times \text{MEyp} + 1,621 \times \text{ka-syönti} - 0,44595 \times \text{rv-pit} + 0,00112 \times \text{rv-pit}^2),$

joka ottaa huomioon kuiva-aineen syönnin, rehuannoksen energia- ja raakavalkuaispitoisuuden vaikutukset (Luke Rehutaulukot 2015). Säilörehulle käytettiin D-arvoon perustuvaa energia-arvoa, väkirehuille valmistajien ilmoittamia energia-arvoja ja mikroleville samaa energia-arvoa kuin rypsilille, koska mikrolevien energia-arvo ei ollut tiedossa.

Korjausyhtälössä MEyp on rehuannoksen korjaamaton ME-pitoisuus (MJ/kg ka) ja rv-pit rehuannoksen raakavalkuaispitoisuus (g/kg ka).

Energiatase on laskettu Luken Rehutaulukoiden (2015) mukaan kaavalla:

$\text{energian saanti (MJ/pv)} - (\text{energia ylläpitoon (MJ/pv)} + \text{maidon energia (MJ/pv)}),$

jossa ylläpidon energia (MJ/pv)= elopaino (kg)^{0,75} × 0,515 ja maidontuotannon energia (MJ/pv)= 5,15 × EKM (kg/pv).

Plasman AV-erotus eli valtimo-laskimopitoisuuksien-erotus laskettiin vähentämällä pitoisuus laskimoplasmassa pitoisuudesta valtimoplasmosta:

AV-erotus = pitoisuus valtimoplasmassa – pitoisuus laskimoplasmassa

Ekstraktio eli maitorauhasen ottoprosentti valtimoplasmosta laskettiin kaavalla:

maitorauhasen ottoprosentti = (pitoisuus valtimoplasmassa - pitoisuus laskimoplasmassa) / pitoisuus valtimoplasmassa *100

Maitorauhasen plasman virtaus on laskettu Fickin säännön mukaan kaavalla, joka perustuu fenyyialaniinin ja tyrosiinin siirtymiseen maitovalkuaiseen (Halmemies-Beauchet-Filleaun ym. 2013b):

maitorauhasen plasman virtaus = (maidon Phe + Tyr) * 0,965/ (Phe ja Tyr AV-erotus)

Maitorauhasen ravintoaineiden otto on laskettu kaavalla:

maitorauhasen ravintoaineiden otto = (pitoisuus valtimoplasmassa - pitoisuus laskimoplasmassa) * maitorauhasen plasman virtaus

Tilastollinen vertailu suoritettiin käyttämällä SAS-ohjelmiston versiota 9.3 ja sen Mixed-proseduuria. Varianssianalyysissä käytetty tilastomalli oli muodoltaan:

$$y_{ijkl} = \mu + A(S)_i + S_j + P(S)_k + D_l + f_{ijkl}$$

jossa μ on keskiarvo, A eläimen vaikutus neliössä (satunnaistekijä), S neliön vaikutus (kiinteä tekijä), P jakson vaikutus neliössä (kiinteä tekijä), D ruokinnan vaikutus (kiinteä tekijä) ja f virhetermi.

Koekäsittelyiden väliset erot testattiin käyttäen polynomialisia kontrasteja (suoraviivainen ja toisen asteen vaikutus). Tilastollinen merkitsevyys määritettiin p-arvoilla, joista $p < 0,001$ on erittäin merkitsevä, $p < 0,01$ hyvin merkitsevä ja $p < 0,05$ merkitsevä.

Kokeessa oli mukana kaksi pötsifistelöityä lehmää. Tämän vuoksi kerättyjen pötsinäytteiden tulokset ovat kahden eläimen tulosten keskiarvoja.

3 TULOKSET

3.1 Koerehujen koostumus

Koerehujen kemiallinen koostumus ja rehuarvo on esitetty taulukossa 6. Valion Seinäjoen laboratoriossa tekemän analyysin mukaan säilörehun D-arvo (sulavan orgaanisen aineen määrä g/kg ka) oli 657 g/kg ka. Säilörehun pH oli 4,74 ja sokereiden osuus 88 g/kg ka. Säilörehun raakavalkuaisen osuus oli 137 g/kg ka.

Kokeessa käytetyt valkuaisrehut erosivat ravitsemukselliselta koostumukseltaan seuraavasti. Kuiva-aineen osuus oli *Spirulinassa* ja *Chlorellassa* hiukan suurempi kuin rypsissä. Tuhkan määrä oli suurin rypsissä. Rypsi sisälsi vähemmän raakavalkuaista kuin mikrolevät. Raakasvan määrä oli rypsissä ja *Spirulinassa* samankaltainen, mutta *Chlorellassa* raakasvaa oli selvästi enemmän. Näin ollen mikroleväseoksen raakasvan osuus oli keskimäärin korkeampi (76,9 g/kg ka) kuin rypsin. Mikrolevien NDF-pitoisuus oli 0.

Taulukko 6. Koerehujen kemiallinen koostumus.

	Säilörehu	Viljaleike	Rypsi	Mikrolevät	
				<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>
pH	4,74	-	-	-	-
Kuiva-aine g/kg ka	23,0	89,1	87,1	93,3	94,6
Kuiva-aineessa g/ kg					
Tuhka	71,1	33,8	70,5	68,0	57,4
NDF	589	334	294	0	0
Raaka-valkuainen	137	130	320	687	608
Raakasva	-	55,2	53,0	58,7	95,1
Maitohappo	65,5	-	-	-	-
Etikkahappo	11,4	-	-	-	-
Propionihappo	-	-	-	-	-
Voihappo	-	-	-	-	-
Sokerit	88,0	-	-	-	-
Ammoniakkitypen osuus					
kokonaistypestä	108	-	-	-	-
D-arvo ¹	657	-	-	-	-

¹Sulava orgaaninen aine g/kg ka

Koerehujen aminohappokoostumus on esitetty taulukossa 7. Valkuaisrehut erosivat aminohappokoostumukseltaan (g/kg rv) erityisesti isoleusiinin ja

histidiinin osalta, joita rypsi sisälsi mikroleviä enemmän. Mikrolevät sisälsivät enemmän fenyylialaniinia kuin rypsi. Mikrolevien välillä oli vaihtelua siten, että välttämättömistä aminohapoista *Spirulina* sisälsi jonkin verran enemmän arginiinia, leusiinia, fenyylialaniinia, treoniinia ja valiinia kuin *Chlorella*. Sen sijaan histidiinin ja lysiinin pitoisuus oli *Chlorellassa* hiukan suurempi kuin *Spirulinassa*. Välttämättömien aminohappojen kokonaisuus ja aminohappojen kokonaisuus raakavalkuaisesta olivat suuremmat *Spirulinassa* kuin *Chlorellassa*.

Taulukko 7. Koerehujen aminohappokoostumus

Aminohapot	Mikrolevät				
g/kg rv	Säilörehu	Viljaleike	Rypsi	Spirulina	Chlorella
Välttämättömät aminohapot g/kg rv					
Arginiini	35,8	50,5	57,8	68,7	53,9
Histidiini	11,0	19,9	25,8	16,0	17,7
Isoleusiini	42,8	34,6	18,7	8,53	9,05
Leusiini	32,0	31,0	36,1	51,5	29,3
Lysiini	29,3	32,9	44,4	35,7	48,5
Metioniini	14,8	20,5	20,4	21,4	18,8
Fenyylialaniini	73,2	73,5	80,5	102	86,6
Treoniini	33,7	30,9	40,6	44,1	33,1
Tryptofaani	5,63	5,69	6,20	5,40	4,80
Valiini	41,2	42,9	46,8	55,6	42,6
Ei-välttämättömät aminohapot g/kg rv					
Alaniini	56,3	39,2	38,8	65,4	60,0
Aspartaamihappo	61,7	60,8	61,5	72,2	55,4
Kysteiini	7,31	33,6	22,1	21,9	13,2
Glutamiini	61,0	170	147	108	81,1
Glysiini	38,0	38,7	48,7	48,5	46,2
Proliini	38,5	64,1	56,0	34,6	37,6
Seriini	32,1	38,7	40,3	45,4	31,6
Tyrosiini	22,6	27,1	31,0	48,8	33,8
Välttämättömät aminohapot	320	342	377	409	344
Ei-välttämättömät aminohapot	317	473	446	445	359
Aminohapot yhteensä	637	814	823	854	703

Koerehujen rasvahappokoostumus on esitetty taulukossa 8. Kokeessa käytetyt valkuaisrehut erosivat rasvahappokoostumukseltaan siten, että rypsisissä kertyydyttymättömien rasvahappojen osuus oli suurin, erityisesti öljyhapon

osuus rypsin rasvahapoista oli suuri. Mikrolevissä oli eniten tyydyttyneitä rasvahappoja, erityisesti *Spirulinassa* palmitiinihapon osuus rasvahapoista oli suuri. *Chlorellassa* oli eniten monitydyttymättömiä rasvahappoja, erityisesti linolihappoa. Monitydyttymättömistä rasvahapoista *Spirulinassa* oli erityisesti linolihappoa ja gammalinoleenihappoa ja rypsissä linolihappoa. Monitydyttymättömiä rasvahappoja kokeessa käytetyt valkuaisrehut sisälsivät lähes saman verran. *Chlorellan* rasvahapoista 25 g/100g jäi tunnistamattomiksi, joista suurin osa oli todennäköisesti monitydyttymättömiä C16-rasvahappoja.

Taulukko 8. Koerehujen rasvahappokoostumus

g/100g rasvahappoja	Säilörehu	Viljaleike	Rypsi	Mikrolevät	
				<i>Spirulina</i>	<i>Chlorella</i>
8:0	-	-	-	0,28	0,03
12:0	0,23	0,05	0,07	0,04	0,04
14:0	0,60	1,21	0,22	0,18	0,16
15:0	0,24	0,10	0,13	0,04	0,06
anteiso 15:0	-	-	0,05	0,03	0,10
iso 15:0	-	-	-	0,15	0,06
16:0	18,3	42,5	8,53	41,6	17,8
17:0	0,22	-	0,10	0,15	0,06
trans-3 16:1	1,85	-	0,14	1,94	1,18
cis-9 16:1	0,34	-	0,84	4,44	0,66
18:0	1,44	1,17	2,01	0,76	0,31
cis-9 18:1	3,80	17,3	42,5	2,52	1,82
cis-11 18:1	0,57	0,63	8,52	0,26	1,93
18:2n-6	16,8	32,6	26,4	23,8	46,8
20:0	0,77	0,12	0,57	-	0,14
18:3n-6	-	-	0,12	21,7	0,15
18:3n-3	51,1	3,40	8,08	0,08	2,59
cis-11 20:1	-	0,60	0,99	0,09	-
20:2n-6	0,14	0,05	0,07	0,23	0,14
22:0	-	-	-	0,23	0,04
20:3n-6	1,13	0,15	0,32	-	0,07
24:0	0,78	0,12	0,24	0,08	0,13
26:0	0,95	0,04	0,11	0,01	0,01
28:0	0,14	-	-	-	-
Tyydyttyneitä	23,6	45,3	12,0	43,7	19,6
Kertatyydyttymättömiä	6,56	18,6	53,0	9,25	5,59
Monityyydyttymättömiä	69,1	36,2	35,0	45,8	49,8
Tunnistamattomia	0,72	-	-	1,28	25,1

3.2 Kuiva-aineen syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus

Koekäsittelyjen vaikutus kuiva-aineen syöntiin, ravintoaineiden saantiin ja sulavuuteen on esitetty taulukossa 9. Koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta lehmien säilörehun tai koko dieetin kuiva-aineen syöntiin tai energian saantiin ($p>0,1$). Energiataseissa oli toisen asteen vaikutus ($p=0,039$) siten, että energiatase oli pienin ruokinnassa, jossa mikrolevä korvasi puolet rypsistä. Energiataseet olivat kuitenkin positiiviset kaikissa koekäsittelyissä. Typen saanti oli suoraviivaisesti suurempaa ($p=0,009$) mikroleväruokinnoissa, kun tarkasteltiin typen saantia koko dieetistä. Kuiva-aineen, orgaanisen aineen, NDF-kuidun ja typen sulavuuteen koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta ($p>0,1$).

Taulukko 9. Ravintoaineiden saanti, energiatase ja sulavuus

	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora- viivainen	2.aste
Kuiva-aineen syönti						
Säilörehu kg/pv	12,3	12,5	12,5	0,52	0,68	0,64
Kokonaissyönti kg/pv	22,1	22,6	22,4	0,51	0,28	0,27
ME ¹ saanti MJ/pv	224	224	226	6,60	0,47	0,68
ME ² saanti MJ /pv	232	237	237	5,40	0,17	0,24
Typen saanti ³ g/pv	529	547	553	11,3	0,009	0,23
Energiatase						
Energiatase ⁴ MJ/pv	24,0	20,1	29,0	11,6	0,13	0,039
Energiatase ⁵ MJ/pv	32,0	33,0	39,0	10,2	0,11	0,58
Sulavuus						
Kuiva-aine	67,1	65,6	66,4	0,69	0,35	0,11
Orgaaninen aine	68,0	66,5	67,4	0,70	0,39	0,10
NDF	56,6	53,7	54,8	1,44	0,28	0,18
Typpi	64,3	63,2	64,0	0,93	0,67	0,16

¹=Muuntokelpoinen energia: $0,016 \times \text{rehuannoksen D-arvo (g/kg ka, MAFF 1975)}$,

²=Muuntokelpoinen energia: $\sum \text{rehun ka-syönti} \times \text{rehun energiasisältö MJ (g/kg)} - (-56,7 + 6,99 \times \text{MEyp} + 1,621 \times \text{dieetin ka-syönti} - 0,44595 \times \text{rv-pit} + 0,00112 \times \text{rv-pit})$ Korjausyhtälössä MEyp on rehuannoksen korjaamaton ME-pitoisuus (MJ/kg ka) ja rv-pit rehuannoksen rv-pitoisuus (g/kg ka, Luke Rehutaulukot), ³= rehun ka syönti* rehun rv-% / 6,25, ^{4,5}= energian saanti (MJ^{1,2}/pv) - (energia ylläpitoon (MJ/pv) + maidon energia (MJ/pv))

Taulukossa 10 on esitetty koekäsittelyiden vaikutus välttämättömien aminohappojen ja aminohappojen kokonaissaantiin. Mikroleväruokinta vähensi

suoraviivaisesti histidiinin saantia ($p=0,003$). Arginiinin, leusiinin, lyysiinin, metioniinin, fenyyialaniinin, treoniinin, valiinin, haaroittuneiden aminohappojen, välttämättömien aminohappojen kokonaismäärän ja aminohappojen kokonaismäärän ($p\leq 0,047$) saanti lisääntyi suoraviivaisesti mikroleväruokinnossa.

Taulukko 10. Aminohappojen saanti

Aminohappojen saanti g/pv	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora- viivainen	2. aste
Välttämättömät aminohapot (g/pv)						
Arginiini	147	154	156	2,6	0,001	0,17
Histidiini	53,6	53,0	50,9	0,81	0,003	0,16
Isoleusiini	119	120	118	3,00	0,93	0,32
Leusiini	107	113	115	2,20	0,001	0,22
Lysiini	110	113	113	2,10	0,047	0,19
Metioniini	58,1	60,3	60,9	1,05	0,004	0,18
Fenyyialaniini	247	260	266	5,10	<0,001	0,21
Treoniini	113	116	116	2,40	0,04	0,22
Tryptofaani	19,0	19,4	19,2	0,39	0,39	0,22
Valiini	142	148	150	2,90	0,003	0,21
Välttämättömät aminohapot	1113	1154	1163	22,5	0,008	0,21
Ei-välttämättömät aminohapot ¹	1285	1325	1328	22,8	0,021	0,18
Aminohapot yhteensä	2393	2475	2488	44,8	0,012	0,19

¹ Alaniini, aspartaamihappo, kysteiini, glutamiini, glysiini, proliini, seriini, tyrosiini

3.3 Plasman aminohapot ja aineenvaihduntatuotteet

Koekäsittelyiden vaikutus plasman aminohappojen ja aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksiin on esitetty taulukossa 11. Plasman histidiinipitoisuus väheni suoraviivaisesti mikrolevän korvatussa rypsiä ($p=0,012$). Koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta muiden välttämättömien aminohappojen pitoisuuksiin plasmassa ($p>0,1$). Koekäsittelyillä ei myöskään ollut vaikutusta välttämättömien, ei-välttämättömien tai aminohappojen kokonaispitoisuuksiin plasmassa ($p>0,1$).

Plasman aineenvaihduntatuotteissa oli toisen asteen vaikutus ($p=0,011$) beetahydroksivoihapon (BHBA) pitoisuudessa. Pitoisuus oli pienin ruokinnassa, jossa mikrolevä korvasi puolet rypsiä. Plasman glukoosin tai vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuuteen koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta ($p>0,1$).

Taulukko 11. Plasman aineenvaihduntatuotteiden (mmol/l) ja välttämättömien aminohappojen ($\mu\text{mol/l}$) ja pitoisuudet

	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora-viivainen	2. aste
Aineenvaihduntatuotteet (mmol/l)						
BHBA	0,89	0,74	0,87	0,041	0,55	0,011
Glukoosi	3,83	3,90	3,81	0,052	0,70	0,13
NEFA	0,14	0,14	0,14	0,001	0,78	0,74
Välttämättömät aminohapot ($\mu\text{mol/l}$)						
Arginiini	97,7	91,8	92,2	3,51	0,17	0,33
Histidiini	56,5	56,2	50,5	6,40	0,012	0,11
Isoleusiini	146	149	152	6,00	0,42	0,97
Leusiini	152	152	156	6,54	0,66	0,88
Lysiini	105	101	104	3,69	0,89	0,57
Metioniini	26,3	26,1	24,8	1,44	0,47	0,73
Fenyylialaniini	53,4	53,3	52,2	1,91	0,63	0,75
Treoniini	121	127	119	6,43	0,79	0,22
Tryptofaani	43,9	43,5	41,6	1,02	0,16	0,57
Valiini	279	278	279	12,1	1,00	0,94
Välttämättömät aminohapot	1080	1079	1071	34,9	0,86	0,94
Ei-välttämättömät aminohapot ¹	1682	1712	1652	38,6	0,46	0,21
Aminohapot yhteensä	2762	2791	2724	68,9	0,65	0,50

¹ Alaniini, aspartaamihappo, kysteini, glutamiini, glysiini, proliini, seriini, tyrosiini

3.4 Maitorauhasen aineenvaihdunta

Maitorauhasen aminohappojen otto (mmol/pv) on esitetty taulukossa 12. Välttämättömistä aminohapoista maitorauhanen otti isoleusiinia suuntaantavasti enemmän mikrolevän määrän lisääntyessä ruokinnassa ($p=0,06$). Muiden välttämättömien aminohappojen tai aminohappojen kokonaismäärien

osalta muutokset maitorauhasen aminohappojen otossa eivät olleet tilastollisesti merkitseviä ($p>0,1$).

Taulukko 12. Maitorauhasen välttämättömien aminohappojen otto (mmol/pv).

Aminohapot (mmol/pv)	Koekäsittelyt			SEM	Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2		Suora- viivainen	2. aste
Välttämättömät aminohapot (mmol/l)						
Arginiini	503	561	584	55,3	0,28	0,78
Histidiini	184	228	204	26,9	0,56	0,28
Isoleusiini	478	562	596	39,9	0,06	0,59
Leusiini	715	889	828	69,2	0,28	0,21
Lysiini	606	725	748	65,3	0,16	0,56
Metioniini	153	174	171	10,5	0,18	0,29
Fenyyialaniini	287	308	282	18,0	0,83	0,27
Treoniini	333	487	435	65,5	0,32	0,25
Tryptofaani	41,8	60,9	41,8	11,6	1,00	0,23
Valiini	604	677	672	49,6	0,36	0,54
Välttämättömät aminohapot	3905	4672	4594	354,8	0,20	0,31
Ei-välttämättömät aminohapot ¹	3300	3917	3451	369,8	0,79	0,28
Aminohapot yhteensä	7204	8589	8015	696,4	0,42	0,28

¹ Alaniini, aspartaamihappo, kysteiini, glutamiini, glysiini, proliini, seriini, tyrosiini

Maitorauhasessa tapahtuva aminohappojen aineenvaihdunta ei eronnut koekäsittelyiden välillä myöskään valtimo-laskimoerotuksen (AV-erotuksen) tai maitorauhasen aminohappojen ottoprosentin suhteen ($p>0,1$, taulukot 15 ja 16 liitteinä).

3.5 Maitotuotokset, maidon pitoisuudet ja maidon rasvahapot

Koekäsittelyiden vaikutus maitotuotokseen ja maidon pitoisuuksiin on esitetty taulukossa 13. Koekäsittelyssä, jossa mikrolevä korvasi puolet rypsiä maitotuotos oli suuntaa-antavasti suurempi kuin muilla ruokinnoilla ($p=0,09$, toisen asteen vaikutus). Myös energiakorjattu maitotuotos (EKM) oli suurin, kun mikrolevällä korvattiin puolet rypsiä, mutta tulos ei ollut enää tilastollisesti

merkitsevä ($p>0,1$). Maidon valkuais- ja rasvatuotoksiin tai maidon pitoisuuksiin koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta ($p>0,1$).

Taulukko 13. Maitotuotokset ja maidon pitoisuudet.

	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora- viivainen	2. aste
Tuotos						
Maito kg/pv	22,7	24,3	22,7	1,50	0,99	0,09
EKM kg/pv	25,5	26,3	24,9	1,39	0,45	0,15
Valkuainen g/pv	848	904	831	35,0	0,71	0,14
Rasva g/pv	1120	1119	1081	70,7	0,61	0,14
Koostumus						
Rasva g/kg	50,4	46,2	49,8	0,28	0,84	0,12
Valkuainen g/kg	38,2	37,5	38,0	0,19	0,70	0,32
Laktoosi g/kg	43,2	43,2	43,5	0,073	0,58	0,80
Urea mg/dl	26,1	25,3	27,7	1,43	0,20	0,15

Mikroleväruokinnan vaikutukset maidon rasvahappokoostumukseen on esitetty taulukossa 14. Mikrolevän lisääminen ruokintaan muutti maidon rasvahappokoostumusta useiden rasvahappojen osalta ($p<0,05$). Muutokset olivat määrällisesti pieniä. Tyydyttyneiden ja monityydyttymättömien rasvahappojen kokonaispitoisuus lisääntyi ($p\leq 0,003$) ja kertatyydyttymättömien rasvahappojen kokonaispitoisuus maitorasvassa väheni ($p<0,001$) suoraviivaisesti mikroleväruokinnoissa. Tyydyttyneiden rasvahappojen osalta erityisesti palmitiinihapon osuus maitorasvassa lisääntyi suoraviivaisesti mikroleväruokinnoissa ($p=0,001$). Monityydyttymättömien rasvahappojen osalta erityisesti linolihapon osuus maitorasvassa lisääntyi suoraviivaisesti, kun mikrolevä korvasi rypsiä ($p<0,001$). Myös gammalinoleenihapon osuus maitorasvassa lisääntyi suoraviivaisesti ($p<0,001$) mikroleväruokinnoissa. Kertatyydyttymättömien rasvahappojen pitoisuuden väheneminen maitorasvassa näkyi erityisesti öljyhapon isomeerien suoraviivaisena vähenemisenä ($p=0,001$), kun mikrolevä korvasi rypsiä.

Taulukko 14. Maidon rasvahappokoostumus

g/100g rasvahappoja	Koekäsittelyt			SEM	Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2		Suoraviivainen	2. aste
4:0	3,52	3,53	3,45	0,093	0,46	0,57
6:0	2,22	2,26	2,23	0,048	0,64	0,19
8:0	1,32	1,35	1,33	0,035	0,50	0,08
10:0	2,88	2,96	2,92	0,087	0,21	0,048
12:0	3,36	3,42	3,39	0,109	0,54	0,21
14:0	11,1	11,3	11,1	0,20	1,00	0,15
<i>cis</i> -9 14:1	1,11	1,05	1,07	0,069	0,26	0,23
15:0	1,01	1,01	0,97	0,022	0,039	0,17
16:0	31,8	32,4	33,5	0,29	0,001	0,36
<i>cis</i> -9 16:1	1,30	1,24	1,30	0,105	0,90	0,21
<i>trans</i> -9 16:1+ <i>iso</i> 17:0	0,32	0,33	0,34	0,005	0,010	0,97
<i>cis</i> -6+7 17:1	0,05	0,13	0,24	0,009	<0,001	0,18
<i>cis</i> -8 17:1	0,075	0,067	0,068	0,0013	0,007	0,037
<i>cis</i> -9 17:1	0,14	0,14	0,15	0,005	0,41	0,28
18:0	10,5	10,3	10,1	0,33	0,32	0,88
<i>iso</i> 18:0	0,03	0,03	0,03	0,002	0,95	0,54
<i>cis</i> -9 18:1+ <i>trans</i> -13-15 18:1	18,5	17,7	17,1	0,15	<0,001	0,60
<i>cis</i> -11 18:1	0,40	0,36	0,32	0,013	<0,001	0,97
<i>cis</i> -12 18:1	0,23	0,23	0,22	0,015	0,050	0,17
<i>trans</i> -4 18:1	0,024	0,025	0,017	0,002	0,028	0,10
<i>trans</i> -6-8 18:1	0,20	0,19	0,15	0,012	<0,001	0,022
<i>trans</i> -9 18:1	0,34	0,23	0,31	0,042	0,46	0,037
<i>trans</i> -10 + 11 18:1	0,90	0,86	0,77	0,033	<0,001	0,14
<i>trans</i> -12 18:1	0,34	0,34	0,29	0,016	0,004	0,029
<i>trans</i> -16+ <i>cis</i> -14 18:1	0,39	0,38	0,36	0,017	0,004	0,18
18:2n-6	1,43	1,76	1,96	0,124	<0,001	0,27
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13 18:2	0,18	0,18	0,16	0,011	0,020	0,14
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -13 18:2	0,09	0,10	0,08	0,006	0,10	0,15
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15 18:2	0,03	0,03	0,03	0,002	0,92	0,17
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:2	0,10	0,12	0,09	0,010	0,34	0,030
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0,38	0,34	0,31	0,016	0,001	0,55
18:3n-3	0,46	0,49	0,47	0,034	0,62	0,29
18:3n-6	0,03	0,05	0,06	0,006	0,001	0,15
20:0	0,18	0,18	0,17	0,007	0,19	0,60
<i>cis</i> -9 20:1	0,14	0,13	0,13	0,004	0,16	0,50
<i>cis</i> -11 20:1	0,05	0,05	0,05	0,004	0,67	0,82
20:3n-6	0,07	0,06	0,06	0,004	0,14	0,21
22:0	0,08	0,09	0,10	0,010	0,003	0,57
22:2n-6	0,06	0,06	0,06	0,003	0,85	0,72
22:3n-3	0,01	0,01	0,01	0,001	0,15	0,25
22:4n-6	0,01	0,01	0,01	0,002	0,97	0,78
22:5 n-3	0,06	0,06	0,06	0,004	0,48	0,93
22:6 n-3 (DHA)	0,01	0,01	0,01	0,001	0,45	0,69
24:0+20:5 n-3 (EPA)	0,04	0,04	0,04	0,003	0,21	0,15
<i>cis</i> -15 24:1	0,01	0,01	0,01	0,000	0,43	0,64
26:0	0,06	0,06	0,05	0,004	0,10	0,83
28:0	0,02	0,02	0,02	0,001	0,53	0,76
<i>trans</i> yht.	3,54	3,39	3,15	0,113	<0,001	0,27
C4-C14 yht.	25,9	26,2	25,9	0,47	0,94	0,25
Tyydyttyneet yht.	70,7	71,4	71,9	0,43	0,001	0,39
Kertatyydyttymättömät yht.	25,1	24,0	23,5	0,29	<0,001	0,09
Monityydyttymättömät yht.	3,05	3,42	3,51	0,200	0,003	0,15
<i>trans</i> 18:1 yht.	2,20	2,04	1,90	0,082	0,001	0,77
18:1 yht.	21,7	20,6	19,9	0,22	<0,001	0,13
18:2 (ilman CLA) yht.	2,21	2,53	2,63	0,156	0,001	0,14
Tunnistamattomat yht.	1,15	1,16	1,14	0,030	0,71	0,63

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Koerehujen koostumus

Kokeessa käytetty nurmisäilörehu oli säilötty natriumnitriitin ja heksamiinin seoksella. Säilöntäaineen vaikutus perustuu suoraan haittamikrobien torjuntaan eikä säilörehun korkea pH sen vuoksi välttämättä laske säilörehun laatua. Myöskään säilörehun ammoniakkitypen osuus kokonaistypestä ei ole vertailukelpoinen esimerkiksi muurahaishapolla säilötyn säilörehun kanssa, sillä natriumnitriitti-heksamiini säilöntäaineen tyyppiyhdisteiden hajoaminen vaikuttaa valmiin rehun ammoniakkipitoisuuksiin (Lamminen 2014). Säilörehu oli siten säilönnälliseltä laadultaan hyvää. Säilörehun D-arvo jäi kuitenkin hiukan alle tavoitearvon (>680 g /kg ka).

Tässä tutkimuksessa käytetyt mikrolevät eivät sisältäneet lainkaan NDF-kuitua. Myöskään aikaisemman tutkimuksen (Wullepit ym. 2012) mukaan mikrolevät eivät sisällä lainkaan NDF-kuitua. Kuitenkin mikrolevien selluloosapitoisen soluseinäaineen on nähty haittaavan sulavuutta yksimahaisilla kotieläimillä (Becker 2007, Skrede ym. 2011). Kokeessa käytetty rypsi sisälsi runsaasti NDF-kuitua. NDF-kuidun on todettu olevan märehtijöiden ruoansulatuksen kannalta hyvä kuidun mittari (Huhtanen 2003). Mikrolevien sisältämän kuidun laatu ja sen soveltuvuus märehtijän ruokintaan ja vaikutus ruoansulatukseen onkin yksi mikroleväruokinnan lisätutkimusta vaativista tekijöistä.

Kokeessa käytetty rypsi sisälsi vähemmän raakavalkuaista kuin mikrolevät. Tämä oli otettu huomioon muodostettaessa koekäsittelyjen valkuaisruokintoja isonitrogeenisiksi eli raakavalkuaisen saanti rypsistä ja mikrolevistä oli eri koeruokinnolla sama. Kokeen valkuaisrehujen välillä oli jonkin verran eroja aminohappokoostumuksessa. Suurimmat erot olivat isoleusiinin ja histidiinin määrässä. Rypsi sisälsi kaksi kertaa enemmän isoleusiinia ja lähes kaksi kertaa enemmän histidiiniä (g/kg rv) kuin mikrolevät. Muiden välttämättömien aminohappojen sekä aminohappojen kokonaismäärien (g/kg rv) osalta erot valkuaisrehujen välillä olivat pieniä. Verrattuna aikaisempaan kirjallisuuteen (Becker 2007), tässä kokeessa käytetyt mikrolevät sisälsivät huomattavan vähän

isoleusiinia. Myös lysiinin määrä oli pienempi kuin kirjallisuudessa (Becker 2007). Keskimäärin lysiinin määrä kokeessa käytetyissä mikrolevissä oli vastaava kuin kokeessa käytetyssä rypsiä. Mikrolevien rypsiä pienempi histidiinin määrä vastasi tutkimuksen hypoteesia.

Tässä kokeessa käytettyjen mikrolevien energiapitoisuutta ei tiedetä. Mikrolevät sisälsivät kuitenkin suhteellisen vähän rasvaa. Myöskään aikaisemmissa mikrolevätutkimuksissa ei ole tarkasteltu mikrolevien energiapitoisuuksia (Franklin ym. 1999, Or-Rashid ym. 2008, Stamey ym. 2012). Tässä tutkimuksessa laskennallisesti määritetyssä muuntokelpoisen energian saannissa ei kuitenkaan ollut eroa koekäsittelyiden välillä, kun laskennassa käytettiin sulavan orgaanisen aineen määrää (MAFF 1975) tai mikroleville samaa energia-arvoa kuin rypsilille.

Mikrolevät sisälsivät enemmän tyydyttyneitä rasvahappoja kuin rypsi, erityisesti *Spirulinan* palmitiinihapon osuus oli suuri. Rypsin rasvahapoista kertatyydyttymättömien rasvahappojen osuus oli suurempi kuin mikrolevissä. Monityydyttymättömiä rasvahappoja mikrolevät sisälsivät hiukan rypsiä enemmän. Mikrolevien monityydyttymättömistä rasvahapoista runsaimmat olivat *Spirulinan* gammalinoleenihappo sekä *Chlorellan* linolihappo. Myös *Spirulina* ja rypsi sisälsivät runsaasti linolihappoa. Säilörehu oli kokeessa käytettyjen rehujen tärkein alfa-linoleenihapon lähde.

Tämän tutkimuksen mikrolevät eivät sisältäneet lainkaan DHA:ta tai EPAa. Myös Ötles & Pire (2001) totesivat *Spirulinan* ja *Chlorellan* sisältävän vain vähän tai ei lainkaan DHA:ta ja EPAa. Aikaisemmissa mikroleväruokintakokeissa mikrolevät ovat usein sisältäneet runsaasti erityisesti DHA:ta (Franklin ym. 1999, Or-Rashid ym. 2008) tai ne ovat olleet DHA-rikastettuja mikrolevävalmisteita (Boeckert ym. 2008, Stamey ym. 2012). Tässä tutkimuksessa käytettyjen mikrolevien rasvahappokoostumus erosi siten suurimmasta osasta mikrolevää käyttäneistä aikaisemmista ruokintakokeista.

4.2 Kuiva-aineen syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus

Pienen D-arvon omaava säilörehu voi vähentää syöntiä (Huhtanen 1998). Tässä kokeessa lehmät söivät säilörehua kuitenkin hyvin, eivätkä koekäsittelyt vaikuttaneet säilörehun syöntiin. Valkuaislisä lisää tutkimusten mukaan säilörehun syöntiä (Tuori 1992, Huhtanen 1998, Shingfield ym. 2003b, Huhtanen ym. 2011). Huhtanen ym. (2011) mukaan valkuaisrehuista rypsi lisää kuiva-aineen syöntiä enemmän kuin soija. Tässä tutkimuksessa säilörehun syönnissä ei ollut eroa koekäsittelyiden välillä, joten mikroleväruokinnoissa säilörehun syönti pysyi rypsiruookinnan tasolla.

Koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta väkirehun syöntiin. Kokeessa käytetty väkirehun osuus oli n. 45% koko dieetistä. Kokeen lehmät olivat loppulaktaatiossa. Lehmien energiataseet olivat positiiviset, plasman vapaiden rasvahappojen (NEFA) pitoisuudet olivat suhteellisen pienet eikä niissä ollut vaihtelua koekäsittelyjen välillä. Lisäksi eläinten elopainon keskiarvo lisääntyi kokeen aikana 38 kg, joten väkirehuannos oli riittävä.

Typen saanti koko dieetistä lisääntyi suoraviivaisesti mikrolevän korvatessa rypsiä. Lisäys ei ollut numeerisesti suuri (+24g/pv, alle 5% lisäys typen kokonaissaantiin) ja johtui asteittain suuremmasta viljaleikkeen määrästä mikrolevän korvatessa rypsiä. Tarkasteltaessa aminohappojen saantia koko dieetistä oli histidiinin saanti suoraviivaisesti vähäisempää ruokinnoissa, joissa mikrolevä korvasi rypsiä, mutta isoleusiinin saannissa ei ollut eroa. Nurmisäilörehu ja viljaleike sisälsivät paljon isoleusiinia (g/kg rv) verrattuna kokeessa käytettyihin valkuaisrehuihin.

Tässä tutkimuksessa mikrolevä maittoi lypsylehmille yhtä hyvin kuin rypsi eikä kuiva-aineen kokonaissyönnissä ollut eroa koekäsittelyiden välillä. Mikrolevän maittavuuteen kiinnitettiin kokeessa erityistä huomiota jokaisen jakson totutuskaudella. Rehuannoksen mikrolevän osuutta nostettiin hitaasti ja jokaisen jakson ensimmäisellä viikolla siihen sekoitettiin melassia. Dreweryn ym. (2012) tutkimuksessa lihanaudoilla havaittiin, että vaikka seoksessa tarjoiltu mikrolevä ei

vähentänyt rehun maittavuutta merkitsevästi, oli maittavuuden väheneminen kuitenkin riskinä, jos mikrolevää tarjottiin yksinään.

Mikroleväruokinta on aikaisemmissa tutkimuksissa vähentänyt kuiva-aineen syöntiä (Franklin ym. 1999, Boeckeaert ym. 2008), mutta ei aina (Stamey ym. 2012, Wullepit ym. 2012). Franklin ym. (1999) pohtivat tutkimuksessaan kuiva-aineen syönnin vähenemisen johtuneen mikrolevän huonommasta maittavuudesta, dieetin rasvapitoisuudesta tai mikrolevän rasvahappokoostumuksesta. Franklinin ym. (1999) tutkimuksessa kontrolliruokinnan sinimailas-maissipohjainen seosrehu sisälsi rasvaa 3,2 g/100g dieetin ka ja koekäsittelyt, pötsisuojaattu ja pötsisuojaamaton mikrolevä yhdistettynä seosrehuun 3,7g ja 3,8 g/100g dieetin ka.

Tämän kokeen valkuaisrehut *Spirulina*, *Chlorella* ja rypsiiviste sisälsivät vähän rasvaa (6, 10 ja 5 g/100g ka, vastaavasti). Mikroleväseos sisälsi keskimäärin hiukan enemmän rasvaa kuin rypsi, mutta isonitrogeeninen mikroleväannos oli rypsiannosta noin puolet pienempi. Kokonaisrasvan saanti valkuaisrehusta oli täten suhteellisen pieni kaikissa koeruokinnissa ja pieneni edelleen jonkin verran mikrolevän korvattaessa rypsiä (104, 85 ja 71 g/pv kokonaisrasvaa valkuaisrehusta koeruokinnissa levä 0, levä 1 ja levä 2, vastaavasti).

Aikaisempien tutkimusten (Franklin ym. 1999, Boeckeaert ym. 2008, Or-Rashid ym. 2008, Stamey ym. 2012) mikrolevävalmisteet ovat usein sisältäneet huomattavia määriä monityydyttymättömiä C20-rasvahappoja, mikä on voinut osaltaan vaikuttaa vähentävästi syöntiin. Käytettäessä runsaasti C20-rasvahappoja sisältävää kalaöljyä lypsylehmien ruokinnassa (esimerkiksi 0-3% ka (Donovan ym. 2000) tai 250g/pv (Shingfield ym. 2003a), on säilörehun kuiva-aineen syönti vähentynyt. Vähentyneen syönnin taustalla pidetään muun muassa pötsifermentaation häiriöitä ja kuidun sulatuksen heikkenemistä, sillä pitkäketjuiset rasvahapot ovat myrkyllisiä pötsimikrobeille (Coppock & Wilks 1991, Donovan ym. 2000). Tyydyttymättömän rasvalisän on raportoitu vähentävän syöntiä enemmän kuin tyydyttyneen rasvalisän ja monityydyttymättömän enemmän kuin kertatyydyttymättömän myös silloin, kun rasvalisä on infusoitu pötsin jälkeen juoksutusmahaan (Bremmer ym. 1998).

Mahdollinen rasvalisä vähentää myös lehmien säilörehun vapaata syöntiä myös johtuen rasvan korkeasta energiapitoisuudesta (Coppock & Wilks 1991). Tässä tutkimuksessa kokonaisrasvan saanti valkuaisrehuista oli suhteellisen pieni ja mikroleväseos sisälsi hyvin vähän monityydyttymättömiä, pitkäketjuisia C20-rasvahappoja, eikä mikroleväruokinta vaikuttanut siten negatiivisesti kuiva-aineen syöntiin.

Tässä tutkimuksessa rypsin korvaaminen mikrolevällä ei vaikuttanut ravintoaineiden sulavuuteen. Ravintoaineiden sulavuus rypsiruoinnassa oli jonkin verran heikompi verrattuna aikaisempien tutkimusten tuloksiin vastaavilla nurmisäilörehupohjaisilla rypsiruoinkinnoilla (Ahvenjärvi ym. 1999, Korhonen ym. 2002a). Aikaisempien tutkimusten mukaan valkuaislisällä ei ole suurta vaikutusta tai se parantaa dieetin kokonaissulavuutta lypsylehmillä (Korhonen ym. 2002a, Rinne ym. 2010, Huhtanen ym. 2011). Valkuaislisä on parantanut myös raakavalkuaisen sulavuutta suoraviivaisesti (Rinne ym. 2010) tai käyräviivaisesti (Colmenero & Broderick 2006).

Aikaisemmissa tutkimuksissa mikrolevän vaikutuksia dieetin sulavuuteen ei märehtijöillä ole juuri raportoitu. Lodge-Ivey ym. (2014) *in vitro*- tutkimuksen perusteella orgaanisen aineen sulavuus pysyy ennallaan kun soijaa korvattiin mikrolevällä. Lodge-Ivey ym. (2014) tutkimuksessa käytetyt mikrolevälajit olivat *Chlorella spp.* ja *Nannochloropsis spp.* ja ne olivat biopolttoainetuotannon rasvauutettua (lipid extracted) jäännösbiomassaa. Myös Drewery ym. (2014) käyttivät tutkimuksessaan biopolttoainetuotannon jäännösbiomassaa (*Chlorella spp.*) kauran olkeen pohjautuvassa lihanautojen ruokinnassa. Tutkimuksessa orgaanisen aineen ja NDF:n sulavuus parani käyräviivaisesti ollen suurinta pienimmällä mikroleväannoksella (50 mg typpeä/elopainokilo). Becker (2004) raportoi Hintz & Heitmannin vuonna 1967 tekemästä tutkimuksesta, jossa hiilihydraattien sulavuuden on raportoitu heikkenevän lihanaudoilla 68 prosentista 52 prosenttiin, kun ruokinnassa on korvattu sinimailasta rumpukuivatulla mikrolevällä. Hintz & Heitmannin tutkimuksessa raakavalkuaisen sulavuus ei kuitenkaan heikentynyt (Becker 2004).

Yksimahaisilla eläimillä mikroleväruokinta on heikentänyt raakavalkuaisen ja orgaanisen aineen sulavuutta merkittävästi. Skrede ym. (2011) tutkivat kolmen mikrolevälajin (*Nannochloropsis spp.*, *Phaeodactylum tricornutum* ja *Isochrysis galbana*) sulavuutta minkeillä, ja totesivat laskennallisesti *Nannochloropsis spp:n* ja *Isochrysis galbanan* raakavalkuaisen näennäisen sulavuuden olevan 18,8–35,5%. Orgaanisen aineen näennäinen sulavuus heikkeni näillä mikrolevädieeteillä 87,0% -> 71,1% (*Nannochloropsis spp.*) ja 87,0% -> 79,4% (*Isochrysis galbana*), kun mikrolevällä korvattiin kalajauhoa 240 g/kg ka. Mikrolevän vaikutukset dieetin sulavuuteen eivät ole kuitenkaan verrattavissa yksimahaisten ja märehtijöiden välillä.

4.3 Plasman aminohapot ja aineenvaihduntatuotteet

Tässä tutkimuksessa käytetyn mikroleväseoksen histidiinipitoisuus oli rypsirehua pienempi ja plasman histidiinipitoisuus väheni suoraviivaisesti mikroleväruokinnoissa. Muiden plasman välttämättömien aminohappojen pitoisuuksissa ei ollut eroa, kuten ei myöskään aminohappojen kokonaismäärissä plasmassa.

Histidiinin määrä dieetissä korreloi herkästi plasman histidiinipitoisuuden kanssa (Korhonen 2003). Tämän syynä voi olla muun muassa histidiinin muita aminohappoja vähäisempi hapetus elimistön muissa kudoksissa ja vähäisempi käyttö muuhun kuin maitovalkuisen synteesiin (Korhonen 2003). Histidiinin määrittäminen plasmasta voi tosin johtaa myös pitoisuuden aliarvioimiseen, sillä histidiinillä on merkitystä punasolujen hemoglobiini- ja karnosiinisynteesissä ja sen pitoisuudet kokonaisveressä saattavat olla plasman pitoisuuksia suurempia (Bequette ym. 1998).

Korhonen (2003) on selvittänyt plasman histidiinipitoisuuden vaihtelua suomalaisilla nurmisäilörehuruokituilla lehmillä yhteensä kuudessa tutkimuksessa (Vanhatalo ym 1999, Korhonen ym. 2000, Kim ym. 2001a, Kim ym. 2001b, Huhtanen ym. 2002a, Korhonen ym. 2002a). Näissä tutkimuksissa plasman

histidiinipitoisuuden vaihtelu on ollut välillä 17–42 $\mu\text{mol/l}$ (keskimäärin 23 $\mu\text{mol/l}$, keskihajonta = 8,3) (Korhonen 2003).

Tässä tutkimuksessa lehmien plasman histidiinipitoisuus oli välillä 56,5–50,5 $\mu\text{mol/l}$. Vaikka plasman histidiinipitoisuus mikroleväruokinnossa väheni suoraviivaisesti, olivat kokeen lehmien plasman histidiinipitoisuudet huomattavasti suurempia kuin aikaisempien tutkimusten kontrollidieeteillä. Esimerkiksi Vanhatalon ym. (1999) tutkimuksessa kontrolliryhmän lypsylehmien plasman histidiinipitoisuus oli 18 $\mu\text{mol/l}$, Korhosen ym. (2000) tutkimuksessa 23 $\mu\text{mol/l}$ ja Huhtasen ym. (2002a) tutkimuksessa 21,2 $\mu\text{mol/l}$. Tässä tutkimuksessa plasman histidiinipitoisuudet olivat samansuuntaisia kuin aikaisempien tutkimusten histidiini-infuusiokäsittelyillä lypsylehmillä, jolloin ne ovat olleet Vanhatalon ym. (1999) tutkimuksessa 47–57 $\mu\text{mol/l}$ (His-infuusio 6,5g/pv), Korhosen ym. (2000) tutkimuksessa 51–64 $\mu\text{mol/l}$ (His-infuusio 4 -6 g/pv) ja Huhtasen ym. (2002a) tutkimuksessa 49,1–51,9 $\mu\text{mol/l}$ (His-infuusio 6,5g/pv). Vanhatalon ym. (1999), Korhosen ym. (2000) ja Huhtasen ym. (2002a) tutkimuksissa histidiini-infuusio lisäsi maitotuotosta ja maidon valkuaistuotosta.

Kim ym. (2001b) tutkimuksessa perusdieetti koostui nurmisäilörehusta, ohrasta ja valkuaisen lähteenä käytetystä höyhenrehusta ja sisälsi näin ollen poikkeuksellisen vähän histidiiniä. Kokeessa lypsylehmien plasman histidiini oli perusdieetillä 12 $\mu\text{mol/l}$. Tutkimuksessa histidiiniä infusoitiin verenkiertoon annostasoilla 3, 6, 9 g/päivässä ja plasman histidiinipitoisuudet suurenivat histidiini-infusiolla pitoisuuksiin 33, 37, 60 $\mu\text{mol/l}$. Tutkimuksessa maitotuotos ja maidon valkuaistuotos lisääntyivät histidiinin annostasolle 6 g/pv saakka, mutta annoksen nostaminen 9g/pv ei enää lisännyt tuotosta.

Aikaisempien tutkimusten (Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000, Kim ym. 2001b, Huhtanen ym. 2002a) tulosten perusteella saattaa olla mahdollista, että plasman histidiinipitoisuuden ollessa alle kriittisen rajan, noin 33–37 $\mu\text{mol/l}$, histidiini olisi lypsylehmien tuotosta rajoittava aminohappo. Plasman histidiinipitoisuuden lisääntyessä 37 $\mu\text{mol/l}$ -> 60 $\mu\text{mol/l}$ tuotos ei kuitenkaan ole enää lisääntynyt vaan kääntynyt lievään laskuun, mikä osoittaa mahdollisesti jonkin toisen aminohapon tulleen maidontuotantoa rajoittavaksi.

Vanhatalon ym. (2001) tutkimuksessa lehmien plasman histidiinipitoisuudet olivat poikkeuksellisen korkeat kaikilla koeryhmillä ($>42 \mu\text{mol/l}$) eikä 6,5g/d histidiini-infuusio tällöin lisännyt maitotuotosta, toisin kuin Vanhatalon ym. (1999) kokeessa. Vanhatalon ym. (2001) tutkimuksen tulokset antavat siten viitteitä siitä, että plasman histidiinipitoisuuden tuotantoa lisäävän vaikutuksen ylärajan olevan 37–42 $\mu\text{mol/l}$ välillä.

Verrattuna näiden aikaisempien tutkimusten tuloksiin tässä tutkimuksessa lehmien plasman histidiinipitoisuus oli suuri kaikissa koekäsittelyissä eikä histidiini näin ollen todennäköisesti rajoittanut maidontuotantoa mikroleväruokinnossa.

Korhonen (2003) kuitenkin esittää, että aminohappojen pitoisuudet plasmassa eivät kerro luotettavasti aminohappojen tarpeesta maidontuotantoon eikä yksinomaan niiden perusteella voida määrittää tuotantoa rajoittavia aminohappoja. Aminohappojen plasmapitoisuuden ja aminohappoinfuusioiden yhteys on Korhosen (2003) mukaan ollut aikaisemmissa tutkimuksissa osin epäjohdonmukaista. Plasmapitoisuuden vaihtelun taustalla voi olla esimerkiksi aminohappojen imeytymisen erot, kuten aminohappojen kilpailu kuljetusproteiineista sekä imeytymisen jälkeinen aineenvaihdunnan vaihtelu, kuten aminohappojen erilainen hyväksikäyttö kudoksissa. Tutkimuksissa, joissa yksittäisten aminohappojen tuotantovaikutusta on tarkasteltu, aminohapot on yleensä infusoitu joko verenkiertoon tai pötsin jälkeen juoksutusmahaan. Yksittäisten aminohappojen infuusiokokeiden vaikutukset maidontuotantoon ovat olleet usein pieniä ja toisinaan keskenään ristiriitaisia (Bequette ym. 1998, Korhonen 2003). Myös muun muassa rehusta saatavan valkuaisen ja energian tai valkuaisen ja glukoosin väliset suhteet voivat vaikuttaa aminohappojen imeytymisen eroihin kudoksissa (Korhonen 2003).

Useiden tutkimusten perusteella kuitenkin tiedetään, että yksittäisillä aminohapoilla voi olla vaikutusta rehuvalkuaisen hyväksikäyttöön (Guinard and Rulquin 1995, Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000, Huhtanen ym. 2002a). Myös ruokinnan eri valkuaisrehujen tiedetään aiheuttavan erilaisia

tuotantovaikutuksia. Tuotantovaikutuksen vaihtelun yhtenä syynä on todennäköisesti valkuaisrehujen erilainen aminohappokoostumus (Korhonen ym. 2002a, Huhtanen ym. 2011). Aminohappojen saantia määrittää kuitenkin pitkälle dieetin karkearehu, jonka vuoksi maidontuotantoa eniten rajoittava aminohappo vaihtelee dieetin karkearehun mukaan (Korhonen 2003). Nurmisäilörehupohjaisissa ruokinnoissa ensimmäisen maidontuotantoa rajoittavan aminohapon on osoitettu olevan histidiini (Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000, Huhtanen ym. 2002a). Maissisäilörehu- tai sinimaillassäilörehupohjaisissa ruokinnoissa tuotantoa ensimmäisenä rajoittava aminohappo on tutkimusten mukaan metioniini ja lysiini (Guinard and Rulquin 1995). Santos ym. (1998) totesivat 108 tutkimuksen meta-analyysissään, että suurimmalla osalla lypsylehmien ruokinnoista metioniini ja lysiini ovat ensimmäisiä tuotantoa rajoittavia aminohappoja. Tutkimuksessa ei kuitenkaan ollut mukana kuin yksittäisiä nurmisäilörehupohjaisia ruokintoja.

Nurmisäilörehupohjaisissa ruokinnoissa mikrobivalkuaisen osuus märehtijän saamasta valkuaisesta on noin 60%, sillä nurmisäilörehun valkuaisen hajoavuus pötsissä on suuri ja sen käyttö mikrobisynteesiin tehokasta (Huhtanen 1998, Korhonen 2003). On esitetty, että histidiini on ensimmäinen rajoittava aminohappo nimenomaan ruokinnoissa, joissa mikrobivalkuaisen osuus on suuri (Huhtanen ym. 2002a). Mikrobivalkuaisen histidiinipitoisuus onkin nurmisäilörehupohjaisissa ruokinnoissa osoittautunut suhteellisen pieneksi (Korhonen 2002b). Myös nurmisäilörehun ominaisuudet, kuten D-arvo, säilönnällinen laatu ja typen laatu ja määrä, vaikuttavat lypsylehmien aminohappojen tarpeeseen. Nurmisäilörehun ominaisuuksilla on merkitystä koko dieetistä saatavaan energiaan, glukoosin esiaineisiin sekä mikrobisynteesiin käytettävään ja ohitusvalkuaiseksi päätyvään valkuaisen määrään (Korhonen 2003). Lypsylehmien aminohappojen tarpeeseen vaikuttavat lisäksi muun muassa laktaatiokauden vaihe ja tuotostaso.

Vaikka mikrobivalkuaisen merkitys märehtijän valkuaisen saannissa on suuri, se ei yksinään riitä kattamaan korkeatuottoisten lypsylehmien valkuaisen tarvetta. Ohutsuolesta imeytyvän valkuaisen määrä ja laatu ovat usein maidontuotantoa rajoittavia tekijöitä (Huhtanen ym. 2011). Optimaalinen valkuaiäydennys lisää

rehun ohitusvalkuaisen määrää, jolloin eläimen käyttöön imeytyy ohutsuolesta enemmän aminohappoja. Nurmisäilörehupohjaissa ruokinnoissa ei pötsimikrobeilla yleensä ole pulaa tyyppistä, jolloin valkuaislisän pötsihajoavuuden kannattaa olla pieni ja aminohappokoostumuksen täydentää mikrobivalkuaista (Korhonen 2003). Esimerkiksi Ahvenjärven ym. (1999) tutkimuksessa rypsirehulisä ei lisännyt mikrobivalkuaisen tuotantoa, vaikka kontrolliruokinnan tyyppipitoisuus oli pieni ja pötsin valkuaislaste kontrolliruokinnalla negatiivinen.

Valkuaislisän optimointi on tuotantovaikutuksen lisäksi tärkeää myös siksi, että dieetin suuret valkuaismäärät heikentävät valkuaisen hyväksikäyttöä (Nousiainen 2004). Hyväksikäytön vähetessä ruokinnan valkuaisylimäärä tulee erityyppisiin sontojen ja erityisesti virtsaan. Valkuaislisän optimointi vaikuttaa siten suoraan tuotannon kannattavuuteen, etenkin valkuaisen ollessa usein tuotannon kallein rehukomponentti (Nousiainen 2004, Apelo ym. 2014). Ylimääräisen valkuaisen aiheuttamat sonnan ja virtsan tyyppipäästöt ovat merkittävä maidontuotannon aiheuttama ympäristöä kuormittava tekijä ja niiden vähentäminen ensisijainen vaatimus maatalouden päästöjen vähentämisessä. Valkuaisen hyväksikäytön optimointi vaikuttaa globaalissa mittakaavassa myös rehuvalkuaisen viljelyn vaatimaan peltopinta-alaan ja sitä kautta koko maatalouden kestävämpään kehitykseen (Apelo ym. 2014). Liiallinen valkuaisruokinta vaikuttaa negatiivisesti myös lehmien hedelmällisyyteen (Nousiainen 2004).

Tässä tutkimuksessa kontrollivalkuaisrehuna käytetyn rypsin positiivinen vaikutus maidontuotantoon ja maidon valkuaispitoisuuteen nurmisäilörehupohjaisissa ruokinnoissa on osoitettu aikaisemmissa tutkimuksissa (Huhtanen 1998, Shingfield ym. 2003b, Rinne ym. 2010, Huhtanen ym. 2011). Rypsin positiivisen tuotantovaikutuksen taustalla on todennäköisesti sen lypsylehmän tarpeisiin tasapainoinen aminohappokoostumus ja riittävä histidiinipitoisuus, jolla on merkitystä erityisesti nurmisäilörehuruokinnassa (Korhonen 2003, Huhtanen ym. 2001, Rinne ym. 2010). Rypsi on runsaiten histidiiniä sisältäviä rehukasveja (Rinne ym. 2010) ja se sisältää enemmän histidiiniä kuin esimerkiksi kalajauho (Korhonen 2003).

Martineaun ym. 2014 tarkastelivat meta-analyysin keinoin rypsin vaikutusta plasman aminohappopitoisuuksiin. Tutkimuksessa plasman histidiinipitoisuus ei lisääntynyt rypsin vaikutuksesta. Sen sijaan plasman välttämättömien aminohappojen pitoisuus lisääntyi tilastollisesti merkitsevästi, kun ruokinnan valkuaisen lähteenä oli rypsi verrattuna soijaan. Huhtasen ym. (2011) mukaan osa rypsin tuotosvasteesta johtuukin rypsiruokinnan syöntiä ja kuiva-aineen saantia ja siten energian saantia lisäävästä vaikutuksesta verrattuna soijaan. Tässä tutkimuksessa mikrolevät eivät vähentäneet syöntiä eivätkä energiansaantia verrattuna rypsiruokintaan eikä koekäsittelyiden välillä ollut eroa plasman välttämättömien aminohappojen kokonaispitoisuudessa.

Aikaisemmissa mikrolevätutkimuksissa ei ole pohdittu mikrolevän aminohappokoostumuksen merkitystä märehtijöille, sillä tutkimukset ovat keskittyneet maidon rasvahappokoostumuksen tarkasteluun mikroleväruokinnossa. Yksimahaisten ruokinnassa mikrolevän aminohappokoostumuksen vaikutusta esimerkiksi broilereiden kasvuun on tarkasteltu yksittäisissä tutkimuksissa. Austic ym. (2013) pohtivat tutkimuksessaan broilereiden kasvua rajoittavien aminohappojen mikroleväruokinnalla mahdollisesti olevan metioniini, lysiini, treoniini tai tryptofaani. Märehtijöiden ja yksimahaisten mikroleväruokinnat eivät kuitenkaan ole keskenään vertailukelpoisia, sillä muun muassa mikrolevän sulavuus on yksimahaisilla todennäköisesti huomattavasti heikompi (Becker 2007, Skrede ym. 2011).

Tässä tutkimuksessa tarkasteltujen aineenvaihduntatuotteiden (NEFA, glukoosi, BHBA) pitoisuudet plasmassa eivät pääsääntöisesti eronneet koekäsittelyjen välillä. Kuitenkin BHBA:n pitoisuus oli pienempi lehmillä, joiden ruokinnassa mikrolevä korvasi puolet rypsistä. Suuri BHBA-pitoisuus voisi kertoa runsaasta ketoaineiden tuotannosta ja riittämättömästä energiansaannista, mutta kokeen lehmien plasman BHBA-pitoisuus oli normaali (alle 1,0 mmol/l) kaikissa koeryhmissä (Duffield 2000). Lisäksi lehmät olivat laktaatiokauden lopulla, lehmien energiataseet olivat positiiviset, plasman NEFA-pitoisuudet suhteellisen pienet ja lehmien paino lisääntyi kokeen aikana, joten energiansaanti oli riittävää. Lehmien, joiden ruokinnassa mikrolevä korvasi puolet rypsistä voihapsen osuus

pötsin VFA-tuotannosta oli pienempi (tulos kahden lehmän keskiarvo), mikä voi selittää plasman pienempää BHBA-pitoisuutta näillä lehmillä.

4.4 Maitorauhasen aineenvaihdunta

Maitorauhasen aminohappojen otto (mmol/pv) oli samankaltaista kaikissa koekäsittelyissä. Välttämättömistä aminohapoista maitorauhanen otti isoleusiinia suuntaa-antavasti enemmän mikrolevän määrän lisääntyessä ruokinnassa. Muiden välttämättömien aminohappojen tai aminohappojen kokonaismäärien osalta maitorauhasen aminohappojen otossa ei ollut eroa. Vaikka plasman histidiinipitoisuus pieneni mikrolevän korvauksessa rypsiä lypsylehmien ruokinnassa, sillä ei ollut vaikutusta maitorauhasen histidiinin ottoon (mmol/pv). Maitorauhanen pystyi siis kompensoimaan plasman pienempää histidiinipitoisuutta lisäämällä ottoprosenttia, tosin ottoprosentin lisäys ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Aikaisemmissa tutkimuksissa plasman histidiinipitoisuutta lisänneet histidiini-infuusiot ovat vähentäneet maitorauhasen histidiinin ottoa (Vanhatalo ym. 1999, Korhonen ym. 2000, Huhtanen ym. 2002a).

Maitorauhasen aineenvaihduntaa tutkittiin tässä tutkimuksessa yleisesti käytetyn valtimo-laskimoerotuksen (AV-erotuksen) avulla. Fickin periaatteen mukaan AV-erotus kertoo kudoksen käyttämän ravintoaineen määrän, kun määritetään ravintoaineen pitoisuus valtimoveressä vähennettynä kudoksesta poistuvan laskimoveren ravintoaineen pitoisuudella kerrottuna verenvirtauksen nopeudella (Fleet & Mephram 1983). Menetelmän käytännön sovelluksessa oletetaan, että valtimoveren ravintoaineiden pitoisuus on yhtäläinen ympäri verenkierron, jolloin valtimoverinäyte voidaan ottaa häntäsuonesta, kuten myös tässä tutkimuksessa tehtiin. Käytettäessä häntäsuonta säästytään valtimokanyloinnilta ja verinäyte voidaan ottaa yhtälailla valtimosta kuin laskimostakin. Tämä pohjautuu oletukseen, että hännän kudosten aineenvaihdunta on erittäin vähäistä ja hännän AV-erotus käytännössä nolla.

Tutkimuksessa laskimoverinäyte otettiin maitosuonesta, sillä sen oletetaan edustavan maitorauhasesta lähtevän laskimoveren pitoisuuksia parhaiten. Kun

AV-erotusmenetelmässä käytetään plasman pitoisuuksia, se sisältää lisäksi oletuksen, että punasolut eivät ole merkittäviä ravintoaineiden kuljettajia. Aminohappojen osalta tämä on osoitettu esimerkiksi Metcalfin ym 1996 ja Cantin ym. 1993 tutkimuksissa (Korhonen 2003). Kuitenkin erityisesti histidiinin osalta oletus on epävarma, sillä histidiiniä tarvitaan muun muassa hemoglobiinisynteesissä punasoluissa (Bequette ym 1998).

Maitorauhanen ottaa aminohappoja ja muita ravintoaineita maitorauhaseen virtaavasta valtimoverestä. Näitä ravintoaineita maitorauhanen käyttää sekä omaan aineenvaihduntaansa ja kudosten uudistamiseen että rasva-, valkuais- ja laktoosisynteesiin maidontuotantoa varten. Maitorauhasen ottamien aminohappojen hyväksikäyttö maitovalkuaiseen vaihtelee siten maitorauhasen oman aineenvaihdunnan tarpeiden mukaan. Lisäksi valkuaisynteesin tehokkuuteen vaikuttavat mm. valtimoverestä saatavien aminohappojen määrä ja niiden keskinäiset suhteet (Bequette ym. 2000).

Maitorauhasen käyttöön päätyvien aminohappojen määrään vaikuttavat aminohappojen jakautuminen elimistön kudosten kesken. Aminohappojen otto on elimistön tarkkaan säätelämä toimintaa, jossa kuljetusproteiinit vastaavat aminohappojen viennistä solujen sisään. Tämän jälkeen aminohappojen hyväksikäytöstä maitovalkuaiseksi vastaavat ainakin eläimen geneettiset ja hormonaaliset tekijät sekä ravitsemukselliset olosuhteet, kuten energian ja muiden maidon esiaineiden saatavuus. Esimerkiksi glukoosin saatavuudella on osoitettu olevan merkitystä aminohappojen hyväksikäytölle (Korhonen 2003, Vanhatalo ym. 2003). Maitorauhanen säätelee paitsi aminohappojen ottoa myös veren virtausta maitorauhaseen, joka osaltaan vaikuttaa aminohappojen saatavuuteen. Bequette ym. (2000) osoittivat, että histidiinin pitoisuus plasmassa vaikuttaa lypsyvuohien maitorauhasen veren virtaukseen siten, että kokeellisesti aiheutettu histidiinin puutos nopeuttaa veren virtausta maitorauhaseen 26–34 %. Virtaus palautui ennalleen palautettaessa dieetin histidiinipitoisuus normaaliksi (Bequette ym. 2000).

Märehtijän aminohappojen virtaus ohutsuoleen ei ole suoraan laskettavissa syödyn rehun määrästä ja koostumuksesta, vaan pötsin mikrobitoiminta muokkaa

paitsi ohutsuoleen päätyvä valkuaisen määrää myös sen aminohappokoostumusta. Pötsimikrobit hajottavat rehuvalkuaista ja käyttävät sen aminohappoja ja rehun ei-valkuaiستypeä omaan kasvuunsa. Märehtijän ohutsuolesta imeytyvä ruokasula sisältää valkuaisen osalta pötsissä hajoamattoman valkuaisen ja mikrobivalkuaisen sisältämät aminohapot. Lisäksi aminohappoja vapautuu jatkuvasti eläimen omista kudoksista valkuaisen kierrätyksen ("turn-over") johdosta. Näin ollen verenkiertoon päätyvien ja lopulta maidontuotantoon käytettävien aminohappojen määrän arvioiminen on haasteellista (Lapierre, 2006). Lisäksi aminohappoja kulkee verenkierrossa paitsi vapaina aminohappoina myös peptideihin sitoutuneena. On epäselvää, mikä on peptidien merkitys maitorauhasen aminohappojen lähteenä (Bequette & Blackwell 1997). Bequette & Blackwell (1997) esittävät, että peptidit toimivat mahdollisesti erityisesti histidiinin ja metioniin lähteenä maitorauhasessa vapaiden aminohappojen lisäksi.

Tässä tutkimuksessa käytettyjen mikrolevien pötsihajoavuutta ei tiedetä. Myöskään aikaisemmassa tutkimuksessa ei ole selvitetty mikrolevien pötsihajoavuutta. Näin ollen ei ole tiedossa kuinka suuri osuus mikrolevien valkuaisesta päätyi ohitusvalkuaiseksi ja mikä oli mikrolevän vaikutus mikrobivalkuaisen muodostumiseen.

4.5 Maitotuotokset, maidon pitoisuudet ja maidon rasvahapot

Maitotuotos oli suuntaa-antavasti suurin lehmillä, joiden ruokinnassa mikrolevä korvasi puolet rypistä. Myös energiakorjattu maitotuotos oli suurin tässä koeryhmässä, mutta ero ei ollut enää tilastollisesti merkitsevä. Koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta maidon valkuais- tai rasvatuotoksiin tai maidon pitoisuuksiin. Kokeen lehmät olivat myöhäisessä tuotoskauden vaiheessa. Maltillinen loppulaktaation tuotos saattoi tasoittaa eroja koekäsittelyiden välillä.

Mikrolevät sisälsivät vähemmän isoleusiinia kuin rypsi. Mikroleväruokintojen pienempi isoleusiinipitoisuus ei kuitenkaan vähentänyt plasman isoleusiinipitoisuutta. Isoleusiinin osuutta maidontuotantoa rajoittavana aminohappona on tutkittu (Korhonen ym. 2002c, Huhtanen ym. 2002a), sillä

niiden plasmapitoisuudet nurmisäilörehuruokituilla lypsylehmillä ovat olleet pieniä ja niiden osuutta histidiinin jälkeen toisena rajoittavana aminohappona on esitetty (Robinson ym. 1999, Varvikko ym. 1999, Korhonen ym. 2002c). Tutkimuksissa (Korhonen ym. 2002c, Huhtanen ym. 2002a) isoleusiini ei ole osoittautunut maidontuotantoa rajoittavaksi aminohapoiksi nurmisäilörehuun ja viljaan pohjautuvassa ruokinnassa. Myöskään tässä tutkimuksessa mikroleväruokinnan pienempi isoleusiinipitoisuus ei rajoittanut maidontuotantoa.

Aikaisemmissa tutkimuksissa mikroleväruokinnoilla ei pääsääntöisesti ole ollut vaikutusta maitotuotokseen (AbuGhazaleh ym. 2009, Christaki ym. 2012, Stamey ym. 2012). Toisinaan maitotuotos on kuitenkin vähentynyt (Boeckert 2008). Boeckert ym. (2008) tutkimuksessa mikrolevävalmiste annettiin suoraan pötsifistelin kautta ja se sisälsi huomattavia määriä monityydyttymättömiä rasvahappoja (8,18–9,35 g DHA:ta/kg syötyä ka). Runsaan monityydyttymättömien rasvahappojen saannin tiedetään vähentävän syöntiä ja ravintoaineiden saantia, ja se voi sitä kautta vähentää maitotuotosta (Bremmer ym. 1998, Donovan ym. 2000).

Yksittäisissä tutkimuksissa mikroleväruokinta on myös lisännyt maitotuotosta (Hostens ym. 2011). Hostensin ym. (2011) tutkimuksessa käytetty mikrolevä oli DHA-rikastettu ”DHA Gold” –valmiste mikrolevälajista *Schizochytrium* spp. (Marteck Biosciences Corp., Columbia, MD). Hostens ym. (2011) pitivät mahdollisena, että mikroleväruokinnan aiheuttama maitorasvan väheneminen olisi johtanut maitorauhasessa laktoosin esiaineiden säästöön. Lisääntynyt laktoosisynteesi olisi näin laskennallisesti voinut aiheuttaa maitotuotoksen kasvua osmoottisen vaikutuksen kautta. Franklinin ym. (1999) tutkimuksessa maitotuotos on mikroleväruokinnoissa pysynyt ennallaan, vaikka kuiva-aineen syönti on vähentynyt. Franklin ym. (1999) eivät kuitenkaan raportoineet, erosivatko esimerkiksi koeryhmien energiansaannit toisistaan. Tutkimuksessa käytetty mikrolevä oli pötsisuojaattua tai pötsisuojaamatonta *Schizochytrium* spp. mikrolevälajia, jota lypsylehmät saivat 910 g päivässä. Boeckertin ym. (2008) tutkimuksessa saman lajin mikroleväruokinta vähensi sekä syöntiä että maitotuotosta. Boeckert ym. (2008) arvelivat eron maitotuotoksessa johtuvan siitä, että heidän tutkimuksessaan käytetty mikrolevävalmiste oli ”DHA Gold”

(Martek Biosciences Corp., Columbia, MD), jolla lehmät saivat kaksinkertaisen määrän DHA:ta verrattuna Franklinin ym. (1999) tutkimukseen.

Tässä kokeessa maidon valkuais- ja laktoosipitoisuudessa ei ollut eroa koekäsittelyiden välillä. Myöskään aikaisemmissa tutkimuksissa mikroleväruokinnoilla ei ole havaittu olevan vaikutusta maidon valkuais- tai laktoosipitoisuuksiin (Boeckert ym. 2008, AbuGhazaleh ym. 2009, Stamey ym. 2012). Hostens ym. (2011) havaitsivat kuitenkin mikroleväruokinnan aiheuttavan suuntaa-antavasti maidon valkuaispitoisuuden vähenemistä.

Tässä tutkimuksessa kontrollirehuna käytetty rypsi on aikaisemmissa tutkimuksissa vaikuttanut positiivisesti maidon valkuaispitoisuuteen verrattuna esimerkiksi soijaan (Huhtanen ym. 2011). Esimerkiksi Martineaun ym. (2014) meta-analyysissä rypsin maitovalkuaisen tuotantovaikutus oli +30 g/pv jokaista 100 g rypsilisäystä kohden. Näin ollen on huomattavaa, että tässä tutkimuksessa mikroleväruokinnat pystyivät ylläpitämään saman valkuaisuutoksen kuin rypsiä. Toisaalta on myös raportoitu, että maidon valkuaispitoisuuteen vaikuttaa enemmän muuntokelpoisen energian saanti kuin rypsiä saatu valkuaislisä (Tuori 1992). Tässä tutkimuksessa lehmien energiansaanti oli riittävää kaikissa koeryhmissä eikä koeryhmien välillä ei ollut eroa energiansaannissa.

Maidon rasvapitoisuudessa ei ollut koekäsittelyiden välillä eroa. Aikaisemmissa tutkimuksissa mikrolevä on usein vähentänyt maidon rasvapitoisuutta (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Hostens ym. 2011). Aikaisemmissa tutkimuksissa maidon rasvapitoisuuden vähenemiseen vaikuttava tekijä on todennäköisesti ollut kokeissa käytettyjen mikrolevien rasvahappokoostumus. Paljon monityydyttymättömiä, erityisesti C20 -rasvahappoja, kuten DHA:ta tai EPAa sisältävän ruokinnan tiedetään aiheuttavan maitorasvan merkittävää vähenemistä, sillä monityydyttymättömien rasvahappojen lisääntyessä dieetissä pötsin biohydrogenaation välituotteiden määrä kasvaa (Boeckert ym. 2008). Biohydrogenaation välituotteista erityisesti *trans*-10 *cis*-12 18:2 CLA:n, tiedetään inhiboivan maitorasvan synteesiä maitorauhasessa (Shingfield ym. 2007). Tässä

tutkimuksessa käytetyissä mikrolevissä oli vain pieniä määriä C20 -rasvahappoja eikä lainkaan DHA:ta tai EPAa.

Tässä tutkimuksessa mikroleväkäsittelyt vaikuttivat maidon rasvahappokoostumukseen useiden rasvahappojen sekä rasvahappojen kokonaispitoisuuksien (tyydyttyneet, kerta- ja monityydyttymättömät) osalta. Muutokset yksittäisissä rasvahapoissa olivat kuitenkin määrällisesti niin pieniä, että niiden merkitys on todennäköisesti vähäinen. Muutokset heijastelivat kokeessa käytettyjen valkuaisrehujen rasvahappokoostumuksen eroja.

Mikroleväruokinnoissa tyydyttyneiden rasvahappojen osuus maitorasvassa lisääntyi. Tulos poikkeaa aikaisempien mikrolevätutkimusten tuloksista, joissa mikrolevälisäykset ovat vähentäneet maidon tyydyttyneiden rasvahappojen osuutta (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Hostens ym. 2011, Christaki ym. 2012). Tämän tutkimuksen mikrolevistä *Spirulinassa* palmitiinihapon osuus rasvahapoista oli suuri. Aikaisemmassakin tutkimuksessa mikrolevät ovat lisänneet tyydyttyneistä rasvahapoista palmitiinihapon osuutta maitorasvassa (Franklin ym. 1999). Mikroleväruokinnoissa kertatyydyttyneiden rasvahappojen osuus maitorasvassa väheni, mikä näkyi erityisesti öljyhapon isomeerien osuuden vähenemisenä maitorasvassa. Valkuaisrehuista rypsi sisälsi enemmän öljyhappoa kuin mikrolevät. Aikaisemmissa tutkimuksissa kertatyydyttymättömien rasvahappojen osuus maitorasvassa on mikroleväruokinnoissa toisinaan lisääntynyt (Franklin ym. 1999, Hostens ym. 2011, Christaki ym. 2012). Näissä tutkimuksissa perusdieetti on kuitenkin ollut erilainen kuin tässä tutkimuksessa, eikä ole sisältänyt esimerkiksi runsaasti kertatyydyttymättömiä rasvahappoja sisältävää rypsiä.

Tässä tutkimuksessa monityydyttymättömien rasvahappojen osuus maitorasvassa lisääntyi mikroleväruokinnoissa. Mikrolevistä *Chlorella* sisälsi kaksinkertaisesti linolihappoa verrattuna rypsiin ja *Spirulinan* monityydyttymättömistä rasvahapoista huomattavan suuri osuus oli gammalinoleenihappoa. Tulos vastaa aikaisempia tutkimuksia, sillä monityydyttymättömien rasvahappojen osuus maitorasvassa on mikroleväruokinnoissa lisääntynyt (Franklin ym. 1999, Boeckert ym. 2008, Hostens ym. 2011, Christaki ym. 2012, Stamey ym. 2012).

Tämän tutkimuksen ja aikaisemman mikrolevätutkimuksen välillä on kuitenkin vaihtelua yksittäisten monitydyttymättömien rasvahappojen osuuksissa. Vaihtelu selittyy ainakin osin mikrolevälisän rasvahappokoostumuksen eroilla, johon vaikuttaa mikrolevälaji sekä mahdollisten käsittelyjen ja yksittäisten rasvahappojen, kuten DHA:n konsentraation lisääminen. Esimerkiksi Franklin ym. (1999) tutkimuksessa lehmät saivat mikrolevästä DHA:ta 4,54–5,52 g/100 g rasvahappoja ja Hostensin ym. (2011) tutkimuksessa 44 g/päivässä.

Maidon rasvahappokoostumuksen muutokset tässä kokeessa erosivat myös sellaisista aikaisemmista tutkimuksissa, joissa mikrolevä on ollut kuivattua *Spirulina*-jauhetta. Toisin kuin tässä tutkimuksessa, Christaki ym. (2012) tutkimuksessa tyydyttyneiden rasvahappojen osuus pieneni ja kertatyydyttymättömien rasvahappojen osuus lisääntyi, kun koekäsittelyssä diettiin lisättiin *Spirulinaa* 40g/pv. Christakin ym. (2012) tutkimuksessa *Spirulinan* määrä oli kuitenkin pieni ja lehmien perusdieetti oli erilainen, sisältäen pääasiassa maissisäilörehua ja soijarouhepohjaista väkirehua. Christaki ym. (2012) eivät myöskään raportoineet *Spirulinan* kemiallista koostumusta. Todennäköisesti erot lehmien perusdieeteissä vaikuttivat kuitenkin myös maidon rasvahappokoostumukseen tämän ja aikaisemman mikrolevätutkimuksen välillä.

Tässä tutkimuksessa maidon ureapitoisuus oli pienin ruokinnassa, jossa mikrolevä korvasi puolet rypsiä. Tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä, mutta voi antaa viitteitä siitä, että valkuaisrehu tuli parhaiten hyväksikäytetyksi ruokinnassa, jossa mikrolevä korvasi puolet rypsiä. Maidon ureapitoisuutta voidaan pitää kohtuullisen luotettavana mittarina typen hyväksikäytölle (Nousiainen 2004). Mikroleväruokinta on vähentänyt maidon ureapitoisuutta myös Gloverin ym. (2012) tutkimuksessa, jossa vertailtiin mikroleväruokinnan vaikutuksia laidun- ja säilörehupohjaisissa ruokinnoissa.

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä tutkimuksessa *Spirulina platensis* ja *Chlorella vulgaris* –mikrolevien 1:1 seoksella korvattiin lypsylehmien valkuaisrehuna käytettävää rypsiä osittain tai

kokonaan. Tutkimuksen ensimmäisen hypoteesin vastaisesti kuiva-aineen syönnissä ei ollut eroa koekäsittelyiden välillä, joten mikrolevä ei vaikuttanut negatiivisesti kuiva-aineen syöntiin.

Tutkimuksen toisen hypoteesin mukaisesti mikroleväruokinnoissa histidiinin saanti oli vähäisempää kuin rypsiruoquinassa. Pienempi histidiinin saanti näkyi plasman histidiinipitoisuuden pienenemisenä. Hypoteesin vastaisesti pienempi histidiinin saanti ei vaikuttanut maitotuotokseen tai maidon valkuaisuutukseen. Lehmien plasman histidiinipitoisuus oli suuri kaikissa ruokinnoissa, mikä saattoi vaikuttaa siihen, että histidiini ei ollut maidontuotantoa rajoittava aminohappo tässä tutkimuksessa. Lisäksi kokeen lehmät olivat myöhäisessä laktaatiokauden vaiheessa, mikä saattoi tasoittaa eroja koekäsittelyiden välillä.

Tutkimuksessa tarkasteltiin syönnin, plasman aminohappopitoisuuksien ja maitotuotoksien lisäksi ravintoaineiden sulavuutta, maitorauhasen aineenvaihduntaa sekä maidon pitoisuuksia ja rasvahappokoostumusta. Ravintoaineiden sulavuuteen, maitorauhasen aineenvaihduntaan tai maidon pitoisuuksiin koekäsittelyillä ei ollut vaikutusta. Valkuaisrehut sisälsivät vähän rasvaa. Valkuaisrehujen erilainen rasvahappokoostumus vaikutti maitorasvan rasvahappokoostumukseen, mutta muutokset olivat määrällisesti pieniä. Rypsin rasvahapoista suuri osa oli öljyhappoa, *Spirulinan* rasvahapoista suuri osa oli palmitiinihappoa ja gammalinoleenihappoa ja *Chlorellan* rasvahapoista suuri osa oli linolihappoa. Nämä erot näkyivät vastaavasti maitorasvan rasvahappokoostumuksessa.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella mikrolevää voidaan käyttää lypsylehmien valkuaisrehuna. Mikrolevällä voitiin laktaatiokauden lopulla korvata rypsiä joko kokonaan tai osittain ilman, että lypsylehmien kuiva-aineen syönti, maito-, valkuais- tai rasvatuotokset vähenevät. Tulokset antoivat viitteitä siitä, että paras tuotantovaikutus saadaan, kun mikrolevä korvaa puolet rypsistä.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani professori Aila Vanhataloa ja tutkijatohtori Anni Halmemies-Beauchet-Filleauta sekä tohtorikoulutettava Marjukka Lammista hyvästä ohjauksesta, konkreettisista neuvoista ja inspiraatiosta aiheen parissa.

LÄHDELUETTELO

- AbuGhazaleh, A.A., Potu, R.B. & Ibrahim, S. 2009. Short communication: The effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. *Journal of Dairy Science* 92: 6156–6159.
- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. & Varvikko, T. 1999. Effects of Supplementation of a Grass Silage and Barley Diet with Urea, Rapeseed Meal and Heat-moisture-treated Rapeseed Cake on Omasal Digesta Flow and Milk Production in Lactating Dairy Cows. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science* 49:3, pp. 179–189.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis, 16th edition. Association of official analytical chemists, Arlington, VA, USA.
- Apelo Arriola, S.I., Knapp, J. R. & Hanigan M. D. 2014. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science* 97:4000–4017.
- Austic, R. E., Mustafa A., Jung B., Gatrell S. & Lei, X. 2013. Potential and Limitation of a New Defatted Diatom Microalgal Biomass in Replacing Soybean Meal and Corn in Diets for Broiler Chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61:7341–7348.
- Becker, W. 2004. Microalgae in human and animal nutrition. *Teoksessa: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. A. Richmond (toim.). Luku: 18. Oxford: Blackwell Publishing.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207–210.
- Bequette, B. J. & Backwell, R. C. 1997. Amino acid supply and metabolism by the ruminant mammary gland. *Proceedings of the Nutrition Society* 56:593–605.
- Bequette, B. J., Backwell, F. R. C. & Crompton, L. A. 1998. Current Concepts of Amino Acid and Protein metabolism in the Mammary Gland of the Lactating Ruminant. *Journal of Dairy Science* 81:2540–2559.
- Bequette, B. J., Hanigan, M. D., Calder, A. G., Reynolds, C. K., Lobley, G. E. & MacRae, J. C. 2000 Amino Acid Exchange by the Mammary Gland of Lactating Goats when Histidine Limits Milk Production. *Journal of Dairy Science* 83:765–775.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W. & Fievez, V. 2008. Effect of Dietary Starch or Micro Algae Supplementation on Rumen Fermentation and Milk Fatty Acid Composition of Dairy Cows. *Journal of dairy science* 91:4714–4727.

- Brennan, L. & Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557–577.
- Bremmer, D. R., Ruppert, L. D., Clark, J. H. & Drackley J. K. 1998. Effects of Chain Length and Unsaturation of Fatty Acid Mixtures Infused into the Abomasum of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 81:176–188.
- Brune, D.E., Lundquist, T.J. & Benemann, J.R. 2009. Microalgal Biomass for Greenhouse Gas Reductions: Potential for Replacement of Fossil Fuels and Animal Feeds. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 135: 1136–1144.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P. & Bonos, E. 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62:794–799.
- Christaki, E., Karatzia, M., Bonos, E., Florou-Paneri, P. & Karatzias, C. 2012. Effect of Dietary *Spirulina platensis* on Milk Fatty Acid Profile of Dairy Cows. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 597–604.
- Colmenero, J. J. O. & Broderick, G. A. 2006. Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Milk Production and Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89:1704–1712.
- Coppock, C. E. & Wilks, D. L. 1991. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal of Animal Science* 69:3826–3837.
- Cursor Oy. 2014. Vuosikertomus 2013. http://www.cursor.fi/sites/cursor40.cursor.local/files/liitteet/cursor_vuosikertomus_222x300mm_2014_web.pdf. Viitattu 20.4.2015.
- Donovan, D. C., Schingoethe, D. J., Baer, R. J., Ryali, J., Hippen A. R. & Franklin S. T. 2000. Influence of Dietary Fish Oil on Conjugated Linoleic Acid and Other Fatty Acids In Milk Fat from Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 83: 2620–2628.
- Drewery, M. L., Sawyer, J. E. & Wickersham, T. A. 2012. Palatability of post-extraction algal residue as a protein supplement for cattle. Texas A&M University College Station. Poster in <http://www.jtmtg.org/JAM/2012/abstracts/337.pdf> Tulostettu: 2.2.2014.
- Drewery, M. L., Sawyer, J. E., Pinchak, W. E. & Wickersham, T. A. 2014. Effect of increasing amounts of postextraction algal residue on straw utilization in steers. *Journal of Animal Science* 92:4642–4649.
- Duffield T. 2000. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 16: 231–253.

- Ekmay, R. & Lei, X.G. 2012. New Insights On Defatted Algal Biomass as Single Cell Protein for Animal Feed. Department of Animal Science. Cornell University. http://ansci.cornell.edu/pdfs/cnc2012_Lei.txt.pdf.
- Euroopan Komissio 2009. Komission asetus (EY) N:o 152/2009. Annettu 27.1.2009. Komission asetus näytteenotto- ja määrittämenetelmistä rehujen virallista valvontaa varten. Liite III Rehuaineiden ja rehuseosten koostumuksenvalvonnassa käytettävät määrittämenetelmät osa H. Raakasvan ja raakaöljynmäärittäys. Julkaistu 26.2.2009. Saatavissa: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:054:0001:0130:FI:PDF> Viitattu: 18.3.2015.
- FAO 2009. Global Agriculture towards 2050. High-Level Expert Forum – How to Feed the World 2050. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf Viitattu: 20.3.2015
- Fleet, I. R. & Mepham, T. B. 1983. Physiological methods used in the study of mammary substrate uptake in ruminants. In Biochemistry of Lactation, edited T. B. Mepham, chapter 15 Elsevier, Amsterdam.
- Franklin, S., Martin, K., Baer, R., Schingoethe, D. & Hippen, A. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. Journal of Nutrition. 129: 2048–2054.
- Friedel, K. 1990. Die Schätzung des energetischen Futterwertes von Grobfutter mit Hilfe einer Cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages by means of a cellulase method]. Wissenschaftliche Zeitung Universität Rostock, N-Reihe 39, 78–86.
- Glover K. E., Budge S, Rose M, Rupasinghe H.P., Maclaren L., Green-Johnson J. & Fredeen A.H. 2012. Effect of feeding fresh forage and marine algae on the fatty acid composition and oxidation of milk and butter. Journal of Dairy Science 95d:2797–2809
- Grinstead, G.S., Tokach, M.D., Dritz, S.S., Goodband, R.D. & Nelssen, J.L. 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. Animal Feed Science and Technology 83: 237–247.
- Guinard, J. & Rulquin, H. 1995. Effects of Graded Amounts of Duodenal Infusions of Methionine on the Mammary uptake of Major Milk Precursors in Dairy Cows. Journal of Dairy Science 78:2196–2207.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Lampi, A-M., Toivonen, V., Shingfield, K. J. & Vanhatalo, A. 2011. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. Journal of Dairy Science 94:4413–4430.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kairenius, P., Ahvenjärvi, S., Crosley, L. K.,

- Muetzel, S., Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Toivonen, V., Wallace, R. J. & Shingfield, K. J. 2013a. Effect of forage conservation method on ruminal lipid metabolism and microbial ecology in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. *Journal of Dairy Science* 96:2428–2447.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kairenius, P., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Givens, D. I. & Shingfield, K. J. 2013b. Effect of forage conservation method on plasma lipids, mammary lipogenesis, and milk fatty acid composition in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage to concentrate ratio. *Journal of Dairy Science* 96:5267–5289.
- Helsingin Sanomat 20.5.2014. "Professori: Suomen vähennettävä riippuvuutta tuontisoijasta" <http://www.hs.fi/ruoka/a1400564567902>.
- Hempel, N., Petrick, I. & Behrendt, F. 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as a key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of applied Phycology* 24:1407–1418.
- Henman, D. J. 2012. Evaluation of Algal Meal as an energy and protein source in pigs diets. Report prepared for the Co-operative Research Centre for High Integrity Australian Pork. Pork CRC. http://www.porkcrc.com.au/4A-102_Final_Report_121204.pdf. Viitattu: 2.2.2015
- Huhtanen, P. 1998. Supply of nutrients and productive responses in dairy cows given diets based on restrictively fermented silage. *Agricultural and Food Science in Finland* 7:219–250.
- Huhtanen, P., Vanhatalo A. & Varvikko, T. 2002a. Effects of Abomasal Infusions of Histidine, Glucose, and Leucine on Milk Production and Plasma Metabolites of Dairy Cows Fed Grass Silage Diets. *Journal of Dairy Science* 85:204–216.
- Huhtanen, P. 2003 Kuidun ja sen laadun merkitys lypsylehmien ruokinnassa. 24.9.2003. Maito ja Me. Valio Oy.
- Huhtanen, P. Hetta, M. & Swensson, C. 2011. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: A review and a meta-analysis. *Canadian Journal of Animal Science* 91:529–543.
- Hostens, M., Fievez, V., Vlaeminck, B., Buyse, J., Leroy, J., Piepers, S., De Vliegher, S. & Opsomer, G. 2011. The effect of marine algae in the ration of high-yielding dairy cows during transition on metabolic parameters in serum and follicular fluid around parturition. *Journal Of Dairy Science* 94:4603–4615.
- Kim, C. H., Choung, J. J. & Chamberlain, D. G.. 2001a. Responses of milk production to the intravenous infusion of amino acids in dairy cows given diets of grass silage and cereal-based supplements. *Journal of Animal Physiology Nutrition* 85: 293–300.

- Kim, C-H., Choung, J-J. & Chamberlain, D. G. 2001b. Estimates of the efficiency of transfer of L-histidine from blood to milk when it is the first-limiting amino acid for secretion of milk protein in the dairy cow. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:1150–1155.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A., Varvikko, T. & Huhtanen, P. 2000. Responses to Graded Postruminal Doses of Histidine in Dairy Cows Fed Grass Silage Diets. *Journal of Dairy Science* 83:2596–2608.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002a. Effect of Protein Source on Amino Acid Supply, Milk Production, and Metabolism of Plasma Nutrients in Dairy Cows Fed Grass Silage. *Journal of Dairy Science* 85:3336–3351.
- Korhonen, M., Ahvenjärvi, S. & Vanhatalo, A. 2002b. Supplementing barley or rapeseed meal to dairy cows fed grass-red clover silage: II. Amino acid profile of microbial fractions. *Journal of Animal Science* 80:2188–2196.
- Korhonen, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2002c. Evaluation of Isoleucine, and Valine as a Second-Limiting Amino Acid for Milk Production in Dairy Cows Fed Grass Silage Diet. *Journal of Dairy Science* 85:1533–1545.
- Korhonen, M. 2003. Amino acid supply and metabolism in relation to lactational performance of dairy cows fed grass silage based diets. *Helsingin yliopiston kotieläintieteen laitoksen julkaisuja* 68.
- Lamminen, M. 2014. Kehitysasteen ja säilöntäaineen vaikutus valkolupiini-vehnäsäilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen. *Kotieläinten ravitsemustieteen pro gradu –tutkielma*. Helsingin Yliopisto, maataloustieteen laitos. 103 s.
- Lapierre, H., Pacheco, D., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Schwab, C. G., Dubreuil, P., Holtrop, G. & Lobley, G.E. 2006. What is the True Supply of Amino Acids for a Dairy Cow? *Journal of Dairy Science* 89(E. Supply):E1–E14.
- Lodge-Ivey S. L., Tracey L. N. & Salazar A. 2014. Ruminant nutrition symposium: The utility of lipid extracted algae as a protein source in forage or starch-based ruminant diets. *Journal of Animal Science* 92:1331–1342.
- Luke Rehutaulukot 2015. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Verkkojulkaisu. https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/Rehutaulukot/Rehutaulukot/laskentaperusteet/energia_arvo_marehtijat Viitattu: 28.4.2015.
- Luke 2015. Viljelykasvien sato 2014. Verkkojulkaisu. <http://www.maataloustilastot.fi/satotilasto> Viitattu: 27.4.2015.
- MAFF 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Technical Bulletin 33. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, UK.
- Martineau, R., Ouellet, D. R. & Lapierre, H. 2014. The effect of feeding canola meal

- on concentrations of plasma amino acids. *Journal of Dairy Science* 97:1603–1610.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 14: 217–232.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297–304. Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry* 160:61–68.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R.G. 2011. *Animal Nutrition*. 7. Painos. Ashford Colour Press Ltd. Gosport.
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97–111.
- Nousiainen, J., Shingfield, K. J. & Huhtanen, P. 2004. Evaluation of Milk Urea Nitrogen as a Diagnostic of Protein Feeding. *Journal of Dairy Science* 87:386–398.
- O'Mara, F. P., Murphy, J. J. & Rath, M. 1998. Effect of Amount of Dietary Supplement and Source of Protein on Milk Production, Ruminal Fermentation and Nutrient Flows in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 81:2430–2439.
- Or-Rashid, M.M., Kramer, J.K.G., Wood, M.A. & McBride, B.W. 2008. Supplemental algal meal alters the ruminal trans-18 : 1 fatty acid and conjugated linoleic acid composition in cattle. *Journal of animal science* 86: 187–196.
- Peltonen-Sainio, P., Jauhiainen, L. & Hannukkala, A. 2007. Declining rapeseed yields in Finland: how, why and what next? *Journal of Agricultural Science* 145:587–598.
- Porter, M.G., Patterson, D.C., Steen, R.W.J. & Gordon, F.J. 1984. Determination of dry matter and gross energy of grass silage. Seventh silage conference held at the Queens university of Belfast 4–6 September 1984, Silage production & utilization
- Ravindra, P., Rudravaram, R., Chandel, A.K., Rao, L.V. & Hui, Y.Z. 2009. *Bio (Single Cell) Protein: Issues of Production, Toxins and Commercialisation Status*. Luku: 7. Nova Science Publishers, USA.
- Raach-Moujahed, A., Hassani, S., Zairi, S., Bouallegue, M., Darej, C., Haddad, B. & Damergi, C. 2011. Effect of dehydrated *Spirulina platensis* on performances and meat quality of broilers. *ROAVS* 8: 505–509.

- Rinne, M., Jaakkola, S., Varvikko, T. & Huhtanen, P. 2010. Effects of Type and Amount of Rapeseed Feed on Milk Production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 49:3 pp. 137–148.
- Rinne, M., Kuoppala, K., Ahvenjarvi, S. & Vanhatalo, A. 2012. Rapeseed expeller is a better protein supplement than soybean expeller in dairy cow diets based on grass-clover silage. *Proceedings of the XVI International Silage Conference, Hameenlinna, Finland, 2-4 July 2012*. Pages: 484–485.
- Robinson, P. H., Chalupa, W., Sniffen, C. J., Julien, W. E., Sato, H., Fujieda, T., Watanabe, K. & Suzuki, H. 1999. Influence of postruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and chewing behaviour, ruminal fermentation, and milk and milk component production. *Journal of Animal Science* 77:2781–2792.
- Salo, M.-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces. *Acta Agraria Fennica* 105: 1–102.
- Santos, F. A. P., Santos, J. E. P., Theurer, C. B. & Huber, J. T. 1998. Effects of Rumen-Undegradable Protein on Dairy Cow Performance: A 12-Year Literature review. *Journal of Dairy Science* 81:3182–3213.
- Stamey, J.A., Shepherd, D.M., de Veth, M.J. & Corl, B.A. 2012. Use of algae or algal oil rich in n-3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 95: 5269–5275.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Ärölä, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P. & Griinari, J. M. 2003a. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science* 77: 165–179.
- Shingfield, K.J., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2003b. Comparison of heat-treated rapeseed expeller and solvent-extracted soya-bean meal as protein supplements for dairy cows given grass silage-based diets. *Animal Science* 77: 305–317.
- Shingfield, K. J. & Griinari J. M. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:799–816.
- Sjaunja, L.O., Baevre, L., Junkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. *Proc. 27th Biennial session Int. Committee for Animal Recording. ICAR, Pariisi, Ranska. s. 156–157.*
- Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K. I., Gislerød, H. R. & Øverland, M., 2011. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences* 20: 131–142.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambet, A. 2006 Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101:87–96.

- Tuori, M. 1992 Rapeseed meal as a supplementary protein for dairy cows on grass silage-based diet, with the emphasis on the Nordic AAT-PBV feed protein evaluation system. *Agricultural Science in Finland*. 1:367–439.
- Tuori, M., Kaustell, K. V. & Huhtanen, P. 1998. Comparison of the protein evaluation systems of feeds for dairy cows. *Livestock Production Science* 55:33–46.
- Wageningen University and Research Centre 2013. Research On Microalgae Portal. <http://www.algae.wur.nl>. Viitattu: 15.8.2014.
- Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V. & Varvikko, T. 1999. Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 82: 2674–2685.
- Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Korhonen, M. & Varvikko, T. 2001. Responses of dairy cows fed grass silage-cereal diet to increase supply of histidine provided either by abomasal infusion of histidine or dietary inclusion of rapeseed meal. In: Joint Meeting of the American Dairy Science Association : proceedings of the 54th Annual Reciprocal Meat Conference, Volume II. *Journal of dairy science* 84 Supplement 1: 364.
- Vanhatalo, A., Varvikko, T. & Huhtanen, P. 2003. Effects of Casein and Glucose on Responses of Cows Fed Diets Based on Restrictively Fermented Grass Silage. *Journal of Dairy Science* 86:3260–3270.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal production. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.
- Varvikko, T., Vanhatalo, A., Jalava, T. & Huhtanen, P. 1999. Lactation and Metabolic Responses to Graded Abomasal Doses of Methionine and Lysine in Cows Fed Grass Silage Diets. *Journal of Dairy Science* 82:2659–2673.
- Venkataraman, L.V., Somasekaran, T. & Becker, E.W. 1994. Replacement Value of Blue-Green-Alga (*Spirulina-Platensis*) for Fish-Meal and a Vitamin-Mineral Premix for Broiler Chicks. *British poultry science* 35: 373–381.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. & Eppink, M.H.M. 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofr* 4: 287–295.
- Wullepitt, N., Hostens, M., Ginneberg, C., Fievez, V., Opsomer, G., Fremaut, D., & De Smet, S. 2012. Influence of a marine algae supplementation on the oxidative status of plasma in dairy cows during the periparturient period. *Preventive Veterinary Medicine* 103:298–303.
- Yap Y. N., Wu J. F., Pond W. G. & Krook L. (1982). Feasibility of feeding *Spirulina*

maxima, *Spirulina platensis* or *Chlorella* sp. to pigs weaned to a dry diet at 4 to 8 days of age. Nutri. Reports Int. 25: 543–552.

Zambiasi, R. C., Prybylski, R., Zambiasi, M. W. & Mendonça, C. B. 2007. Fatty Acid Composition of Vegetable oils and Fats. B. CEPPA, Curitiba, 25:1, pp. 111–120.

Ötles, S. & Pire, R. 2001. Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species. Journal of AOAC International 84:1708–1714.

LIITE 1.

Taulukko 15. Maitorauhasen välttämättömien aminohappojen valtimo-laskimo (AV) -erotus ($\mu\text{mol/pv}$).

Aminohappojen AV- erotus ($\mu\text{mol/pv}$)	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora- viivainen	2.aste
Arginiini	40,8	40,9	42,5	3,00	0,70	0,85
Histidiini	14,9	16,1	14,5	0,96	0,77	0,19
Isoleusiini	40,1	40,7	45,1	2,83	0,26	0,60
Leusiini	57,7	64,3	62,1	4,07	0,46	0,42
Lysiini	50,2	51,0	55,1	3,59	0,38	0,71
Metioniini	12,4	12,5	12,8	0,92	0,78	0,93
Fenyyialaniini	22,9	22,7	21,4	1,61	0,54	0,79
Treoniini	28,0	35,5	31,8	4,60	0,59	0,36
Tryptofaani	3,84	4,50	3,92	0,778	0,95	0,55
Valiini	50,2	48,8	50,7	3,64	0,93	0,73
Välttämättömät aminohapot	321	337	340	21,5	0,56	0,82
Ei-välttämättömät aminohapot ¹	267	270	255	16,8	0,65	0,71
Aminohapot yhteensä	588	606	596	35,7	0,89	0,75

¹ Alaniini, aspartaamihappo, kysteini, glutamiini, glysiini, proliini, seriini, tyrosiini

Taulukko 16. Maitorauhasen välttämättömien aminohappojen otto% valtimoverestä.

Aminohappojen otto%	Koekäsittelyt				Tilastollinen merkitsevyys	
	Levä 0	Levä 1	Levä 2	SEM	Suora- viivainen	2. aste
Arginiini	41,7	44,5	46,3	2,88	0,31	0,90
Histidiini	28,8	33,3	33,1	7,61	0,29	0,49
Isoleusiini	27,4	27,2	29,8	2,04	0,44	0,59
Leusiini	38,0	42,7	40,0	3,59	0,70	0,43
Lysiini	48,0	50,6	53,4	3,02	0,26	0,99
Metioniini	47,6	47,8	51,9	3,18	0,32	0,58
Fenyyialaniini	42,9	42,0	41,0	2,44	0,61	0,98
Treoniini	23,1	27,6	26,7	3,21	0,47	0,52
Tryptofaani	8,80	10,3	9,27	1,768	0,86	0,58
Valiini	18,0	17,4	18,2	1,49	0,94	0,70
Välttämättömät aminohapot	29,6	31,3	31,8	2,10	0,49	0,83
Ei-välttämättömät aminohapot ¹	15,9	15,7	15,5	0,89	0,73	0,99
Aminohapot yhteensä	21,3	21,7	21,9	1,18	0,73	0,96

¹ Alaniini, aspartaamihappo, kysteini, glutamiini, glysiini, proliini, seriini, tyrosiini